

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Incorporación de plata para incrementar las propiedades antimicrobianas de
aleaciones de titanio

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ramón Pérez Tanoira

Director

Jaime Esteban Moreno

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología



INCORPORACIÓN DE PLATA PARA
INCREMENTAR LAS PROPIEDADES
ANTIMICROBIANAS DE ALEACIONES DE
TITANIO

Tesis Doctoral

Ramón Pérez Tanoira

Madrid, 2014

Tesis Doctoral presentada por:

RAMÓN PÉREZ TANOIRA

Director de la Tesis:

Dr. Jaime Esteban Moreno

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



D. Jaime Esteban Moreno, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense, especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, Médico Adjunto del Departamento de Microbiología Clínica de la Fundación Jiménez Díaz.

CERTIFICA:

Que Ramón Pérez Tanoira, Licenciado en Ciencias Químicas, especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, ha completado bajo su dirección los trabajos conducentes a la obtención de resultados para optar al título de DOCTOR por la Universidad Complutense de Madrid. Y en vista de lo adecuado de su desarrollo, se autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral para su evaluación.

Y para que conste, se firma en Madrid, a 25 de febrero de 2014.

Fdo.: D. Jaime Esteban Moreno

AGRADECIMIENTOS

La verdad es que tengo mucha suerte porque tengo que dar gracias a mucha gente el que me hayan apoyado y ayudado para llegar a este momento.

Pero quiero empezar por las personas que siempre han creído y confiado en mí, incluso en momentos en que ni yo mismo lo hacía, mis padres. Siempre han tenido la paciencia y el cariño necesarios hasta que empecé a descubrir que era lo que realmente me motivaba. Ojalá mi padre pudiera ver este momento porque estaría muy orgulloso, yo por lo menos cada día que pasa me siento más orgulloso de ser su hijo. Les doy las gracias porque me han dado mucho más de lo que necesitaba y por supuesto el haber llegado hasta aquí es gracias a ellos.

A mi hermana y mi cuñado por todo el apoyo que me han dado durante toda la vida, sus sabios consejos y sobre todo por ser un excelente modelo de vida. La verdad es que han tenido mucha suerte de haberse encontrado el uno al otro. Dos personas tan buenas y con tantos valores que se enfrentan a la vida siempre con una sonrisa.

A mi director de tesis. He tenido mucha suerte de trabajar con él. Me ha enseñado muchas cosas y es un magnífico modelo profesional a seguir. Además de mi director lo considero un amigo. También he tenido mucha suerte con mi tutor durante la especialidad, quizás no le guste lo que voy a decir por el tema de los años pero lo considero como un padre. Siempre he recibido mucho cariño y apoyo por parte de los dos. Me han ayudado y enseñado muchas cosas personales y profesionales, además de dos excelentes facultativos he tenido la suerte de tener dos amigos. He tenido también mucha suerte con Ignacio y Javier, los otros dos facultativos del servicio durante la especialidad. Unos fantásticos profesionales de los que he recibido siempre mucho apoyo al igual que todos los demás compañeros del servicio durante estos años de residencia. Ahora solo me quedan las personas por las que seguramente he sido la persona más envidiada del hospital durante estos años. Mis compañeras de residencia. Empezando por mi amiga y co-residente, Cuca, con la que he tenido la suerte de compartir y vivir tantos momentos. De la que he recibido muchísimo cariño y he aprendido tantas cosas. Y las mejores amigas que se pueden tener en el lugar de trabajo como son María, Mari, Marta, Iris, Laura, Chela y Carolina.

A toda mi familia, dentro de la cual además de mi madrina Carmen y mis primos incluyo también a gente que aunque no nos une la sangre, nos unen sentimientos que yo considero algunas veces más importantes. Dentro de esta gente tengo que dar especialmente las gracias a todos los vecinos de mi madre por ayudarla tanto pero especialmente a Margosita que siempre está pendiente de mi madre y que sin su ayuda sería imposible todo esto.

A mis sobrinos por todo el cariño que siempre me han dado y por hacer que me sienta tan orgulloso de ser su tío. Tengo además mucha suerte por tener como

ahijada una chica preciosa y una de las personas más inteligentes que he conocido en mi vida.

En estos agradecimientos no puedo olvidarme de mi gran amiga Olalla que siempre ha estado ahí y de todo el apoyo y la amistad recibidos por una persona maravillosa como es Laura.

A Inés por ser tan buena persona y darme cobijo durante tanto tiempo al igual que Pedro. Una excelente persona que ha hecho que al volver de Etiopía me sintiese otra vez en casa.

A todos mis amigos de Vigo, Santiago, Redondela, Portonovo, Orense...por tantos momentos divertidos que echo muchísimo de menos. Debido a la distancia no puedo verlos tantas veces como me gustaría. Pero como me han demostrado y como noto cada vez que los veo nos une una amistad que no importa el tiempo que pasemos sin vernos y cuando he necesitado su ayuda siempre me la han dado. Al igual que mis amigos residentes de otras especialidades del hospital, del grupo cañas estables que siempre hemos hecho honor a este nombre. Tengo mucha suerte de haber coincidido con todos ellos. Espero que el paso del tiempo no nos separe si no que nos una aún más ya que he comprendido que es muy difícil encontrar gente como ellos.

A Jose Cocho y los demás componentes del laboratorio de metabolopatías del Hospital Clínico de Santiago, por todo el cariño y el apoyo que me han transmitido siempre.

A mis amigos de Cádiz, Brasil y Galicia que junto mis amigos del hospital fueron mi familia adoptiva en Madrid. Creo que no puedo contabilizar cuantas tortillas y pulpo he preparado para todos ellos y espero que queden muchas más.

Como veis el mérito no es mío, el mérito de este trabajo es de todos vosotros.

Utopía
(Eduardo Galeano)

*Ella está en el horizonte.
Me acerco dos pasos,
ella se aleja dos pasos más.
Camino diez pasos
y el horizonte se corre
diez pasos más allá.
Por mucho que yo camine
nunca la voy a alcanzar.
¿Para qué sirve la utopía?
Sirve para eso:
para caminar.*

Teño o corazón senlleiro
(Celso Emilio Ferreiro)

*Teño o corazón senlleiro
e orfo na noite fría.
Non importa, agardaréi
polo albor do novo día.
Teño lobos, teño sombras,
teño a sorte fuxidía.
Non importa, agardaréi
polo albor do novo día.
Está mudo o reixiñol
que outrora cantar solía.
Non importa, agardaréi
polo albor do novo día.
Que está comigo a esperanza,
fiando, fía que fía...
Ela fía i eu confío
no albor do novo día.*

**Dedicada a mis padres por todo el apoyo y cariño que
me han dado siempre y espero que mi padre pueda
verme orgulloso desde las nubes del horizonte.**

COMUNICACIONES ORIGINALES Y PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

COMUNICACIONES ORALES A CONGRESOS

- 2011 “*Staphylococcus spp.* adhesion to barrier layer-modified Titanium alloy”. C. Pérez-Jorge Peremarch, A. Conde Del Campo, R. Pérez Tanoira et al. 24th ISTA Congress (International society for technology in arthroplasty). Brujas, Bélgica.
- 2010 “Bacterial adherence to anodized titanium alloy” C. Pérez-Jorge, R. Pérez-Tanoira, A. Conde Del Campo et al. BIO-COAT (Workshop perteneciente al XI Congreso Nacional de materiales) Zaragoza, España.

PÓSTER

- 2012 "Antibacterial properties of Ti-O doped With Different Concentrations of silver" R. Pérez - Tanoira, Adolfo Mosquera, C. Pérez-Jorge et al. 20th Annual Meeting of EORS (European Orthopaedic Research Society). Amsterdam, Netherlands.
- 2012 “Propiedades antibacterianas de Ti-O dopado con diferentes concentraciones de plata” R. Pérez -Tanoira, C. Pérez-Jorge, Adolfo Mosquera et al. XVI Congreso Nacional de la SEIMC. Bilbao, España.
- 2012 "Antibacterial effects of silver ion implantation" R Pérez -Tanoira, F Martín Julian, C. Pérez-Jorge et al. 20th Annual Meeting of EORS. Amsterdam, Holanda.

- 2012 "Estudio de adherencia bacteriana de *Staphylococcus spp* a discos de Ti_6Al_4V anodizado con flúor" C. Pérez-Jorge, R. Pérez-Tanoira, A. Conde Del Campo et al. XVI Congreso Nacional de la SEIMC. Bilbao, España.
- 2012 "Propiedades antibacterianas de DLC con plata" R. Pérez Tanoira, C. Pérez-Jorge, Iñigo Ciarsolo et al. XVI Congreso Nacional de la SEIMC. Bilbao, España.
- 2011 "Adherencia de *Staphylococcus spp.* en superficies modificadas con islas de plata sobre aleación de titanio-aluminio-vanadio" R. Perez-Tanoira, C. Perez-Jorge, J. L. Endrino et al. XV Congreso Nacional de la SEIMC. Málaga, España.
- 2010 "Estudio de adherencia bacteria sobre titanio recubierto con flúor anodizado C. Pérez-Jorge, R. Pérez-Tanoira , A. Conde Del Campo et al. XIV Congreso Nacional de la SEIMC.Barcelona, España.
- 2010 "Enhanced antibacterial properties of biomedical surfaces through micrometric silver islands" R. Perez-Tanoira, C. Perez-Jorge, J. L. Endrino et al. BIO-COAT (Workshop en el XI Congreso Nacional de Materiales) Zaragoza, Spain.

PUBLICACIONES Y OTRAS COMUNICACIONES

- 2013 "Chapter 3: Bacterial adherence to biomaterials used in surgical procedures"J. Esteban, R. Pérez-Tanoira, C. Pérez-Jorge and E. Gómez-Barrena Microbiology for Surgical Infections: Diagnosis, Prognosis and Treatment. Editorial Elsevier

"Doped TiO_2 anodic layers of enhanced Colloids and

- antibacterial properties" M. A. Arenas, C. Pérez-Jorge, A. Conde Del Campo, E. Matykina, J. M. Hernández-López, R. Pérez-Tanoira, J.J. De Damborenea, E. Gómez-Barrena, J. Esteban. Surfaces: Biointerfaces 10.1016/j.colsurfb.2012.12.051
- 2013
- 2012 "In vitro assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO(2) nanotubes on Ti-6Al-4V alloy." C. Pérez-Jorge, A. Conde Del Campo, M.A. Arenas, R. Pérez-Tanoira, Matykina E, de Damborenea JJ, Gómez-Barrena E, J. Esteban. J Biomed Mater Res A 100(7): 1696-1705.
- 2012 "Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver Islands R. Perez-Tanoira, C. Perez-Jorge, J. L. Endrino, E. Gomez-Barrena, D. Horwat, Pierson, J. Esteban. J Biomed Mater Res A 100(6): 1521-1528.
- 2012 "Microbiological diagnosis of prosthetic joint infection" J. Esteban, C. Pérez-Jorge, R. Pérez-Tanoira and E. Gómez-Barrena (2012) "Biomaterials associated infection. Infected Total Joint Arthroplasty" Publisher Springer Verlag. Editor Rihard Trebse DOI 10.1007/978-1-4471-2482-5
- 2010 "Bacterial adherence to anodized titanium alloy" C. Pérez-Jorge, R. Pérez-Tanoira, A. Conde Del Campo, M.A. Arenas, E. Matykina, J.J. De Damborenea, E. Gómez-Barrena, J. Esteban. Journal of Physics: Conference Series 252 (2010) 012011 doi:10.1088/1742-6596/252/1/012011
- 2010 "Antibacterial properties of biomedical surfaces through micrometric silver islands" R. Perez-Tanoira, C. Perez-Jorge, J. L. Endrino, E. Gomez-Barrena, D. Horwat, Pierson, J. Esteban (2010) Journal of Physics: Conference Series 252 (2010) 012015 doi:10.1088/1742-6596/252/1/012015

OTROS MÉRITOS

2013 Patente con título: " Materiales de Titanio
Anodizados con Flúor"

Entidad titular:
Consejo Superior de
Investigaciones
Científicas
P201030720

ABREVIATURAS

MPE: matriz polimérica extracelular
LPS: lipopolisacáridos
Núcleo OS: núcleo oligosacárido
MSCRAMM: moléculas adhesivas de la matriz
MEC: matriz extracelular
PIA: polisacárido intercelular de adhesión
FnBPA: proteína de unión a fibronectina A
FnBPB: proteína de unión a fibronectina B
CNA: la proteína de unión a colágeno
ClfA: factor de aglutinación A
ClfB: factor de aglutinación B
AtLA: autolisina de *S. aureus*.
AtLE autolisina de *S. epidermidis*.
Embp: proteína de unión de la matriz extracelular
BAP: proteína asociada a la biopelícula
AAP: proteína asociada a la acumulación
PIA: polisacárido de adhesión intercelular
PNAG: poli N-acetil glucosamina
LIO: lentes intraoculares.
PMMA: polimetil-metacrilato.
UHMWPE: polietileno de ultra-elevado peso molecular
PG910: poliglactina 910
PGA: ácido poliglicólico
PVC: cloruro de polivinilo
PMMA: polimetilmetacrilato
LDPE: polietileno de baja densidad
HA: hidroxiapatita (HA)
BCP: fosfato de calcio bifásico
ZrO₂: zirconia
Ti: titanio
Co-Cr-Mo: aleación de cobalto-cromo-molibdeno
Ti-6Al-4V: aleación de titanio-aluminio-vanadio
WCA: ángulo de contacto del agua
BSA: glicoproteína bovina de suero bovino
 ΔG_{wi} : energía libre de interacción de dos entidades i cuando se sumergen en agua.
Fn: fibronectina
PPP: plasma pobre en plaquetas
HAS: albúmina humana
SCN: estafilococo coagulasa negativo
PHMB: polihexametileno biguanida.
ROS: especies reactivas de oxígeno.
SWCNTs: nanotubos de carbono de pared simple
C60: fullereno
Al₂O₃: alúmina
CuO: óxido de cobre

MgO: óxido de magnesio

Ag: plata

AGNPS: nanopartículas de plata

Cu: cobre

Ti-O: óxido de titanio

DLC: carbono tipo diamante

TiO-lowAg: óxido de titanio dopado con una concentración de plata de 6,4%

TiO-highAg: óxido de titanio dopado con una concentración de plata de 17,3%

1×10^{16} Ag: dosis de 1×10^{16} ion/cm² de plata

5×10^{16} Ag: dosis de 5×10^{16} ion/cm² de plata

2×10^{17} Ag: dosis de 2×10^{17} ion/cm² de plata

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de una prótesis produce una mayor susceptibilidad del paciente a la infección⁽¹⁻²⁾. Con frecuencia la única solución es la retirada de la prótesis infectada⁽³⁾.

Una de las estrategias que está ganando impulso en la lucha contra la infección es el uso de nanomateriales antibacterianos (materiales en nanofase con propiedades bactericidas intrínsecas). Tales propiedades conducen a diferentes mecanismos antibacterianos entre los que se incluyen:

- (1) La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o iones de metales pesados que dañan las proteínas y el ADN de las bacterias.
- (2) Penetración o interrupción de las membranas celulares por nanopartículas.
- (3) Interrupción de la transducción de electrones.

Un pequeño número de bacterias provenientes de la piel o mucosa del paciente, donde estas bacterias normalmente se encuentran, probablemente contaminan la prótesis durante la colocación de esta.

La adherencia bacteriana al material es la primera fase en el desarrollo de la biopelícula. El desarrollo de la biopelícula en la superficie de un biomaterial se trata de un fenómeno complejo que clásicamente se puede dividir en dos fases⁽³⁻⁴⁾. Una fase inicial física, instantánea y reversible (primera fase) y una fase molecular y celular, función del tiempo e irreversible (segunda fase)⁽³⁻⁶⁾.

En la fase inicial de la adherencia, las bacterias planctónicas llegan a la superficie del biomaterial utilizando interacciones físicas de largo alcance⁽⁷⁾. En la segunda las reacciones moleculares entre la superficie bacteriana y la superficie del sustrato son las fuerzas predominantes⁽⁸⁻⁹⁾. La adherencia bacteriana depende en gran medida de la superficie, estructura atómica y la composición de los biomateriales implantados^(4, 10-11).

Los factores que influyen en la adhesión bacteriana a la superficie de un biomaterial incluyen la composición química del material, carga superficial, hidrofobicidad y rugosidad de la superficie o configuración física.^(4, 12-15) Por lo tanto, se puede argumentar que la prevención de la adhesión bacteriana sin el uso de antibióticos puede ser uno de los caminos más eficaces de reducir las infecciones de implantes ortopédicos⁽¹⁶⁻¹⁷⁾. Debido a que no podemos actuar sobre las propiedades bacterianas, la investigación acerca de la prevención de

la infección de biomateriales se centra en el desarrollo de nuevos biomateriales y la modificación de los ya existentes con el objetivo de que sean menos propensos a la adherencia bacteriana, que puede conducir al desarrollo de biopelícula, especialmente contra estafilococos, los cuales son los principales agentes involucrados en este tipo de infecciones^(13, 18-21).

El titanio puro o aleaciones de este se usan frecuentemente en cirugía ortopédica debido a su resistencia a la corrosión, buena biocompatibilidad, propiedades mecánicas y baja toxicidad. Una de las estrategias que está ganando impulso en la lucha contra la infección es el uso de metales nobles, normalmente la plata⁽²²⁻²³⁾.

Estudios previos han demostrado que los iones de plata reaccionan con grupos donantes de electrones (N, O, o S), que están presentes en las bacterias como imidazol, amino, fosfato, grupos carboxilo o tiol en las proteínas o en ADN. Aunque la interacción con los grupos sulfhidrilo (tiol) de aminoácidos, parece jugar un papel esencial en la inactivación bacteriana, no está claro si esto por sí solo explica el desacoplamiento de la cadena respiratoria de la fosforilación oxidativa y el colapso de la fuerza protón-motriz (PMF) en la membrana citoplasmática⁽²²⁻²⁴⁾. Pequeñas concentraciones de iones de plata son suficientes para que exista actividad microbicidas. Los iones de Ag son además lo suficientemente pequeños como para romper las membranas celulares de las bacterias y conseguir entrar con el fin de alterar la función enzimática. Estos iones desplazan otros cationes, que son necesarios para que tengan lugar las reacciones enzimáticas. Los efectos indirectos a través de los cambios en el entorno de cargas también pueden repercutir en la adherencia y producir otros efectos contra las bacterias⁽²⁵⁻²⁹⁾.

2. OBJETIVOS

Evaluar la adherencia bacteriana en aleaciones de titanio modificadas mediante diversas técnicas de incorporación de plata para detectar la que presentará mejores resultados desde el punto de vista de la prevención de la infección.

Las modificaciones son las siguientes:

1. Islas de plata
2. DLC con plata
3. Ti-O dopado con diferentes concentraciones de plata
4. Plata implantada iónicamente
5. YSZ con plata

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un primer estudio con cepas de colección de *S. aureus* 15981, proporcionada amablemente por el Dr. Lasa⁽³⁰⁾ y *S. epidermidis* ATCC 35984 (ambas cepas productoras de biopelícula). Posteriormente se estudió la adherencia empleando seis cepas clínicas de *S. aureus* y otras seis de *S. epidermidis*. Estas cepas se aislaron de pacientes diagnosticados de infección

protésica empleando sonicación⁽³¹⁾. Las cepas clínicas de *Staphylococcus* son productoras de biopelícula⁽³²⁾.

Cada una de las nuevas modificaciones con plata se comparó con los controles de Ti-6Al-4V o Ti-6Al-4V modificado mediante recubrimientos sin plata.

Los experimentos de adherencia de estafilococos fueron realizados como describen Kinnari et al y Ramon et al. Los discos secos fueron teñidos durante 15 minutos con un método rápido de tinción de fluorescencia utilizando el Live / Dead ® Kit de viabilidad bacteriana (Backlight™)⁽³³⁾.

De cada material se fotografiaron 8 campos con una cámara Nikon Coolpix 8400 (Nikon, Melville, NY) bajo un microscopio de fluorescencia a una magnificación de 40x. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Se estudiaron 24 fotografías para cada material y bacteria. Se calculó el área de superficie cubierta con bacterias adheridas utilizando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD).

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas no paramétricas. Para comparar dos muestras entre sí, se utilizó la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney y para más de dos muestras la prueba de Kruskal-Wallis. Los estudios estadísticos se realizaron mediante el software EPI-Info versión 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA).

4. RESULTADOS

4.1. TEST DE ADHERENCIA BACTERIANA

4.1.1 CEPAS DE COLECCIÓN

Ambas cepas han mostrado menor adherencia bacteriana para los materiales modificados. En todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$ test de Wilcoxon Mann-Whitney).

S. epidermidis mostró mayor adherencia que *S. aureus* para todos los materiales, excepto para la plata implantada.

4.1.2 CEPAS CLÍNICAS

La mayor parte de las cepas clínicas han mostrado menor adherencia a los materiales modificados con plata al compararlos con el material no modificado o modificado sin plata ($p < 0,05$ test de Wilcoxon Mann-Whitney).

Al comparar las modificaciones de Ti-6Al-4V que incorporan diferentes concentraciones de plata se encontró que TiO-highAg no producía una disminución de la adherencia bacteriana. En el caso de la plata implantada no hubo diferencias para la mayor parte de las cepas clínicas entre la dos dosis más altas.

Las modificaciones que no incorporan plata presentaron una disminución de la adherencia bacteriana estadísticamente significativa con respecto al material sin modificar para la mayor parte de las cepas clínicas, excepto Ti-O.

Las cepas p4, p101 y p95 mostraron mayor tendencia a adherirse a todos los materiales.

4.2 PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS ADHERIDAS

4.2.1 CEPAS DE COLECCIÓN

La incorporación de plata no afectó de la misma forma a todos los materiales y cepas.

En el caso de Ti-O y la plata implantada iónicamente, la incorporación de plata produjo un aumento en el porcentaje de bacterias muertas con respecto al material sin modificar para *S. aureus*. En el caso de *S. epidermidis* produjo un aumento en todos los casos.

Para *S. aureus* con respecto al material modificado sin plata, obtuvimos un aumento en el caso del DLC y el porcentaje disminuyó con YSZ. Se encontraron diferencias entre las dos dosis más altas de plata implantada. Para *S. epidermidis* el porcentaje aumentó de forma estadística cuando incorporamos plata a Cu-Mn-O, YSZ y cuando dopamos el Ti-O con la dosis más alta. Además para *S. epidermidis* no encontramos diferencias entre las diversas modificaciones para la plata implantada iónicamente.

S. epidermidis fue la cepa que presentó mayor proporción de bacterias muertas para todas las modificaciones que incorporaban plata, excepto en el caso de DLC-Ag y la plata implantada iónicamente. Además fue la cepa que mayor proporción de bacterias muertas presentó para DLC y Ti-O.

En los cinco estudios realizados la aleación de Ti-6Al-4V se comportó de forma diferente para cada una de las cepas de colección

4.2.2 CEPAS CLÍNICAS

Al incorporar plata se produjo un aumento del porcentaje excepto en el caso de YSZ-Ag y Ag-Cu-Mn-O con respecto a YSZ y Ti-6Al-4V respectivamente.

Entre los materiales modificados con plata:

- Para la mayoría de cepas clínicas no existieron diferencias estadísticas entre TiO-lowAg y TiO-highAg
- Para la mayoría de cepas clínicas no existieron diferencias entre las dos dosis más bajas de plata implantada y entre las dos dosis más altas.

Al comparar las modificaciones sin plata y la aleación de Ti-6Al-4V:

- En la mayoría de los casos, la aleación de Ti-6Al-4V presentó un porcentaje mayor que la modificación con Cu-Mn-O o Ti-O.

- La modificación con DLC produjo un aumento en la mayoría de los casos.

Las cepas p4, p95 y p101 fueron las que mayor proporción de bacterias muertas presentaron para los diferentes materiales.

4.3 COMPARACIÓN DE LA ADHERENCIA BACTERIANA PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS SIN PLATA

4.3.1 CEPAS DE COLECCIÓN

Cuando comparamos los diferentes recubrimientos sin plata, Cu-Mn-O fue el que presentó de manera estadísticamente significativa una menor adherencia bacteriana, seguido por DLC, Ti-O y YSZ.

4.3.2 CEPAS CLÍNICAS

Cu-Mn-O mostró una menor adherencia bacteriana, seguido por YSZ, DLC and Ti-O.

4.4 COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS SIN PLATA

4.4.1 CEPAS DE COLECCIÓN

Para *S. aureus* el Cu-Mn-O presentó un porcentaje mayor que todos los demás recubrimientos sin plata de forma estadísticamente significativa. En los demás casos no hay diferencias significativas.

Para *S. epidermidis* DLC es el que presentó mayor proporción de bacterias muertas y YSZ el que menor, de manera estadísticamente significativa.

4.4.2 CEPAS CLÍNICAS

DLC presentó un mayor porcentaje para la mayor parte de las cepas clínicas seguido por YSZ, Ti-O y Cu-Mn-O.

4.5 COMPARACIÓN DE LA ADHERENCIA BACTERIANA PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS CON PLATA

4.5.1 CEPAS DE COLECCIÓN

Para *S. aureus*, TiO-highAg mostró menor adherencia bacteriana. El recubrimiento con plata que presentó una mayor adherencia bacteriana fue

1×10^{16} Ag. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre DLC-Ag, TiO-lowAg and 5×10^{16} Ag.

Para *S. epidermidis*, el recubrimiento que presentó menor adherencia bacteriana fue 2×10^{17} Ag. No existieron diferencias estadísticas entre 5×10^{16} Ag y DLC-Ag. YSZ-Ag mostró mayor adherencia bacteriana. Ag-Cu-Mn-O no ha presentado diferencias estadísticas con TiO-high Ag y 1×10^{16} Ag.

4.5.2 CEPAS CLÍNICAS

Ag-Cu-Mn-O mostró la menor adherencia bacteriana. TiO-highAg es la modificación que mayor adherencia presentó.

4.6 COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS CON PLATA

4.6.1 CEPAS DE COLECCIÓN

Para ambas cepas, 2×10^{17} Ag presentó el mayor porcentaje de bacterias muertas. Aunque para *S. aureus* la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a DLC-Ag y 5×10^{16} Ag. Para *S. epidermidis* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para Ag-Cu-Mn-O, TiO-highAg y el resto de modificaciones con plata implantada.

Para *S. aureus* TiO-highAg presentó el menor porcentaje de bacterias muertas, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a TiO-lowAg.

Para *S. epidermidis*, DLC-Ag presentó la menor proporción de bacterias muertas aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a YSZ-Ag.

4.6.2 CEPAS CLÍNICAS

DLC-Ag fue la modificación con una mayor proporción de bacterias muertas para la mayor parte de las cepas clínicas, y la diferencia fue estadísticamente significativa. Seguida por 2×10^{17} Ag y YSZ-Ag.

1×10^{16} y TiO-lowAg presentaron el menor porcentaje de bacterias muertas.

5. DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue analizar como diferentes modificaciones que incorporan plata de un material normalmente utilizado en prótesis ortopédicas, como es el Ti-6Al-4V, pueden reducir la adhesión bacteriana. Por otro lado también se ha investigado la capacidad bactericida de dichas modificaciones sobre las bacterias durante su fase de adherencia.

En este estudio, la adherencia bacteriana fue evaluada empleando cepas de colección y cepas clínicas. Las cepas de colección poseen una carga genética menor que las cepas clínicas aisladas de pacientes debido a que son cepas adaptadas al laboratorio, las cuales han perdido genes debido a numerosos pases de cultivo. Se realizaron experimentos adicionales utilizando cepas clínicas procedentes de pacientes con infección de implantes osteoarticulares. Las cepas de colección y las cepas clínicas mostraron diferentes resultados.

Para las cepas clínicas, la incorporación de plata ha disminuído la adherencia bacteriana con respecto a la aleación de Ti-6Al-4V y las otras modificaciones que no incorporan plata. Las modificaciones sin plata han mostrado una menor adhesión bacteriana con respecto a Ti-6Al-4V, con la excepción de Ti-O.

La plata produce un efecto catalítico sobre Ti-O, activando las propiedades antimicrobianas de este. Una pequeña cantidad de plata tiene un mayor efecto catalítico⁽³⁴⁾.

La implantación iónica de plata en una dosis superior a 5×10^{16} Ag no ha mostrado una reducción significativa de la adhesión bacteriana.

Cuando comparamos todas las modificaciones que incorporan plata y aquellas que no la incorporan, Ag-Cu-Mn-O y Cu-Mn-O han presentado una menor adhesión bacteriana para las cepas de colección y las cepas clínicas. Esto es debido a la presencia del cobre, ya que los metales nobles tienen propiedades antimicrobianas⁽³⁵⁾. Además hemos encontrado que Ag-Cu-Mn-O es la modificación que libera la mayor cantidad de plata.

Para las cepas clínicas, con la excepción de las islas de plata y la combinación de plata y Ti-O, la incorporación de este ión ha producido un aumento del porcentaje de bacterias muertas con respecto al material no modificado.

La incorporación de plata al material modificado ha producido un aumento del efecto bactericida excepto en el caso de Ti-O y YSZ.

Para la mayor parte de las cepas clínicas la incorporación de más plata a TiO-lowAg o 5×10^{16} Ag no ha aumentado el efecto bactericida.

Debido a que el mecanismo bactericida de la plata tiene como diana los residuos de cisteína, que están presentes en todas las proteínas, la plata es eficaz contra un amplio espectro de bacterias y es poco probable que se desarrollen bacterias con resistencia a la plata^(24, 36).

Por el momento los efectos tóxicos de la plata, tales como " argiria " la cual puede teñir de gris o de gris azulado algunas partes de la piel o de los tejidos del cuerpo, la argirosis ocular, gastroenteritis o la aparición de cuadros de fiebre, no han sido asociados de forma habitual con recubrimientos con plata de distintas endoprótesis⁽³⁷⁻³⁸⁾.

6. CONCLUSIONES

1. Tanto las cepas de colección como las cepas clínicas han presentado menor adherencia bacteriana para los materiales modificados con respecto a la aleación de Ti-6Al-4V, excepto en el caso de la modificación de Ti-O. En este último caso, una baja concentración de plata ejerce un mejor efecto catalítico y consigue una disminución en la adherencia bacteriana. La implantación iónica de plata por encima de 5×10^{16} Ag no supone diferencias significativas en la adherencia bacteriana.
2. La aleación Cu-Mn-O es el recubrimiento sin plata que presentó una menor adherencia bacteriana, y Ti-O la que más bacterias adheridas presentó.
3. Las modificaciones con Cu-Mn-O y Ti-O no han producido un aumento del porcentaje de bacterias muertas al compararlas con la aleación de Ti-6Al-4V. DLC es la modificación sin plata que presentó un mayor efecto bactericida y Cu-Mn-O la que menos.
4. Entre las modificaciones con plata, Ag-Cu-Mn-O y Ti-O con diferentes concentraciones de plata no presentaron un aumento del efecto bactericida con respecto a Ti-6Al-4V. Sin embargo DLC-Ag, la plata implantada iónicamente y YSZ-Ag sí presentaron dicho efecto. DLC-Ag fue la modificación que presentó mayor efecto bactericida y 1×10^{16} Ag y TiO lowAg las que menos.
5. Ha existido una amplia variabilidad en el comportamiento de las distintas cepas clínicas en relación con la adherencia y la capacidad bactericida de las modificaciones analizadas, lo que demuestra la necesidad de estudiar este tipo de organismos a la hora de obtener conclusiones válidas para la mayoría de los casos.

ABSTRACT

1. INTRODUCTION

The presence of an implanted device results in an increased susceptibility to infection for the patient⁽¹⁻²⁾. Often the only solution to an infected implanted device is its surgical removal⁽³⁾.

One of the strategies that are gaining renewed attention for combating the threat of bacterial infection is the use of antibacterial nanomaterials consisting of nanophase materials with intrinsic bactericidal properties. Such properties lead to distinctive antibacterial mechanisms including:

- 1) Production of reactive oxygen species (ROS) or heavy metal ions which are known to damage proteins and DNA in bacteria
- 2) Penetration or disruption of cell membranes by nanoparticles
- 3) Interruption of electron transduction.

Small numbers of bacteria from the patient's skin or mucous membranes, where these bacteria normally occur, probably contaminate the prostheses during the surgical implantation of the device.

Bacterial adhesion to a material surface is the first step in biofilm development. It can be described as a two-phase process including an initial, instantaneous, and reversible physical phase (phase one) and a time-dependent and irreversible molecular and cellular phase (phase two)⁽³⁻⁶⁾.

During the first phase, planktonic bacteria move onto or are moved onto a material surface because of the effects of physical forces⁽⁷⁾. In the second phase of adhesion, molecular reactions between bacterial surface structures and substrate surfaces become predominant⁽⁸⁻⁹⁾. The adherence process depends largely on the surface and near-surface atomic structure and composition of implanted biomaterials^(4, 10-11).

Factors influencing the bacteria adherence to a biomaterial surface include chemical composition of the material, surface charge, hydrophobicity, as well as surface roughness and/or physical configuration^(4, 12-15). Thus, it can be argued that the prevention of bacterial adhesion without drugs may be one of the most effective ways to reduce orthopedic implant infections⁽¹⁶⁻¹⁷⁾. It would be desirable to develop biomedical coatings for implants, which are repellent to bacteria, to minimize the colonization of the implant surface with circulating planktonic bacteria that can lead to biofilm development, especially against staphylococci, which are the leading cause of these infections^(13, 18-21).

Pure titanium and titanium alloys are frequently used as biomaterials in orthopedic surgery because of their corrosion resistance, good biocompatibility, mechanical properties, and low-cell toxicity. One of the strategies that is gaining renewed attention for combating the threat of bacterial infection is the use of an antibacterial noble metal, usually silver⁽²²⁻²³⁾.

Studies have shown that silver ions react with electron donor groups (N, O, or S atoms), which are present in bacteria as amino, imidazole, phosphate, carboxyl, or thiol groups in proteins or in DNA. While the interaction with thiol groups seems to play an essential role in bacterial inactivation, it is unclear whether this alone explains the uncoupling of the respiratory chain from oxidative phosphorylation and the collapse of the proton motive force (PMF) at the cytoplasmic membrane⁽²²⁻²⁴⁾. Only small amounts of silver ion concentrations are required for microbiocidal activity. Ag ions are small enough to disrupt bacterial cell membranes and gain entry in order to disrupt enzyme function. These ions displace other cations, which are needed for enzyme enabled reactions. Indirect effects through changes in the surrounding charge environment may also impact on adherence and other effects against microorganisms⁽²⁵⁻²⁹⁾.

2. OBJECTIVES

Evaluating bacterial adhesion in titanium modified alloys by various techniques of incorporating silver to detect that type of modification has the best results in preventing infection. The modifications are the following:

1. Silver islands
2. DLC with silver
3. Ti-O doped with different concentrations of silver
4. Silver ion implanted
5. YSZ with silver

3. MATERIALS AND METHODS

Staphylococcal adhesion experiments were performed first with the collection strains *S. aureus* 15981 kindly provided by Dr. Lasa⁽³⁰⁾ and *S. epidermidis* ATCC 35984. Subsequently six clinical strains from *S. aureus* and six other of *S. epidermidis* were used. These had been isolated from patients with implant-related infection diagnosed by sonication⁽³¹⁾. The clinical Staphylococcus strains are positive for biofilm development⁽³²⁾.

Each Ti-6Al-4V modified with silver was compared with unmodified Ti-6Al-4V and Ti-6Al-4V modified without silver.

Staphylococcal adhesion experiments were performed as described by Kinnari et al and Ramon et al. The dried plates were stained for 15 min with a rapid fluorescence staining method using the Live/DeadVR Bacterial Viability Kit (BacklightTM)⁽³³⁾. On each plate, eight fields were viewed and photographed with a Nikon Coolpix 8400 (Nikon, Melville, NY) under a fluorescence microscope at 40x magnification. All experiments were performed in triplicate. The number of microphotographs studied was 24 for each material and bacterium. The surface area covered with adhered bacteria was calculated using the ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD).

For the statistical analysis nonparametric tests were performed. Mann–Whitney or Wilcoxon tests were used for two samples and the Kruskal–Wallis test was used for more than two samples. EPI-Info software version 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA) was used to perform the statistical studies.

4. RESULTS

4.1 BACTERIAL ADHESION TESTS

4.1.1 COLLECTION STRAINS

Both strains showed less bacterial adherence to the modified materials. In all cases the differences were statistically significant ($p < 0.05$ test of Wilcoxon Mann-Whitney).

S. epidermidis showed more adhesion than *S. aureus* to all materials, except to the implanted silver.

4.1.2 CLINICAL STRAINS

Most of the clinical strains showed less bacterial adherence to silver-modified materials when compared to unmodified or modified materials without silver ($p < 0.05$, test of Wilcoxon Mann-Whitney).

By comparing the modifications of Ti-6Al-4V incorporating different concentrations of silver we found that TiO-highAg produced no decrease in bacterial adherence. In the case of the silver ion-implanted, most of the clinical strains did not differ for the two higher doses.

The modifications that do not incorporate silver in most clinical isolates produced statistically significant decrease in bacterial adherence with respect to the unmodified material, except Ti-O.

p4, p101 and p95 strains showed a greater tendency to adhere to the different materials.

4.2 PERCENTAGE OF THE BACTERIA WHICH WAS DEAD ON EACH SURFACE

4.2.1 COLLECTION STRAINS

The incorporation of silver did not affect all the different materials and strains in the same way.

In the case of Ti-O and ion-implanted silver, the incorporation of silver produced an increase in the percentage of dead bacteria compared to the unmodified material for *S. aureus*. In the case of *S. epidermidis*, it produced an increase in all cases.

For *S. aureus* compared with the modified material without silver, there was an increase in the case of the DLC and the percentage decreases with

YSZ. There were differences between the two highest doses of implanted silver. For *S. epidermidis*, the percentage statistically increases when we incorporate silver to Cu-Mn-O, YSZ as well as the Ti-O dope with the highest dose of silver. In addition, no differences between the various modifications to the silver ion-implanted were found for *S. epidermis*.

S. epidermidis showed a greater proportion of killed bacteria to all modifications with silver except in the case of DLC-Ag and silver ion-implanted. This was also the strain with the highest proportion of dead bacteria poses for DLC and Ti-O.

In the five studies alloy Ti-6Al-4V behaves differently for each of the collection strains.

4.2.2 CLINICAL STRAINS

An increased percentage occurs when silver is incorporated except YSZ-Ag and Ag-Cu-Mn-O with respect YSZ and Ti-6Al-4V respectively.

Among the materials modified with silver:

- For most clinical isolates there are no statistical differences between TiO-lowAg and TiO-highAg.
- For most clinical strains there are no statistical differences between the two lowest doses of implanted silver and between the highest dose.

By comparing the modifications without silver and alloy Ti- 6Al -4V:

- In most cases Ti -6Al -4V has a higher percentage than the modification with Cu-Mn -O or Ti-O .
- The DLC modification causes an increase in most cases.

The strains p4, p95 and p101 had the highest proportion of dead bacteria for different materials.

4.3 COMPARISON OF BACTERIAL ADHESION FOR MODIFIED MATERIALS WITHOUT SILVER

4.3.1 COLLECTION STRAINS

When comparing the different coatings without silver, Cu-Mn-O showed a statistically significant lower bacterial adhesion, followed by DLC, Ti-O and YSZ.

4.3.2 CLINICAL STRAINS

Cu-Mn-O showed a lower bacterial adhesion, followed by YSZ, DLC and Ti-O.

4.4 COMPARISON OF PERCENTAGE OF THE BACTERIA WHICH WAS DEAD FOR MODIFIED MATERIALS WITHOUT SILVER

4.4.1 COLLECTION STRAINS

For *S. aureus* Cu-Mn-O had a higher percentage than all other non-silver coatings. In other cases there were no significant differences.

For *S. epidermidis* DLC had a higher proportion of dead bacteria and YSZ the lowest

4.4.2 CLINICAL STRAINS

DLC showed a higher percentage in most of the clinical strains followed by YSZ, Ti-O and Cu-Mn-O.

4.5 COMPARISON OF BACTERIAL ADHESION FOR MODIFIED MATERIALS WITH SILVER

4.5.1 COLLECTION STRAINS

For *S. aureus*, TiO-highAg showed less bacterial adherence. The silver coating that had a higher bacterial adherence was 1×10^{16} Ag. No statistically significant differences between DLC-Ag, TiO-lowAg and 5×10^{16} Ag were detected.

For *S. epidermidis*, the coating with the lowest bacterial adherence was 2×10^{17} Ag. No statistically significant differences between 5×10^{16} Ag and DLC-Ag. YSZ-Ag showed highest bacterial adherence.

Ag-Cu-Mn-O showed no statistical differences with TiO-highAg and 1×10^{16} Ag.

4.5.2 CLINICAL STRAINS

Ag-Cu-Mn-O showed the lowest bacterial adherence.

TiO-highAg increased bacterial adherence

4.6 COMPARISON OF PERCENTAGE OF THE BACTERIA WHICH WAS DEAD FOR MODIFIED MATERIALS WITH SILVER

4.6.1 COLLECTION STRAINS

For both strains, 2×10^{17} Ag had the higher percentage of dead bacteria. Although for *S. aureus* the difference was not statistically significant with respect to DLC-Ag and 5×10^{16} Ag. For *S. epidermidis* no statistically significant differences between 2×10^{17} Ag, Ag-Cu-Mn-O, TiO-highAg and the other modifications with implanted silver were detected.

For *S. aureus* TiO-highAg had the lowest percentage of dead bacteria although the difference was not statistically significant with respect TiO-lowAg.

For *S. epidermidis* DLC-Ag had the lowest percentage of dead bacteria although the difference was not statistically significant with respect YSZ-Ag.

4.6.2 CLINICAL STRAINS

DLC- Ag was the modification with a higher proportion of killed bacteria for most of the clinical isolates, and this difference was statistically significant. It was followed by 2×10^{17} Ag and YSZ-Ag.

1×10^{16} , and TiO-lowAg shows the lowest percentage of dead bacteria.

5. DISCUSSION

The purpose of this study was to analyze how different modifications incorporating silver of alloy Ti- 6Al -4V commonly used in orthopedic prostheses could reduce bacterial adhesion. On the other side we have also investigated the bactericidal capacity of different modifications with silver.

In this study, bacterial adherence was evaluated using collection and clinical strains. The collection strains have a lower genetic load than clinical isolates of patients because they are adapted laboratory strains, which lost genes because of several passages in culture. Additional experiments were performed to evaluate the adhesion using clinical isolates from patients with a diagnosis of infection of the prosthetic joint. The results for collection and clinical strains showed different results.

For clinical strains, the incorporation of silver has reduced bacterial adhesion to the alloy of Ti -6Al-4V and other modifications without silver. Modifications without silver showed also lower bacterial adhesion than Ti-6Al-4V, with the exception of Ti-O.

Silver produces a catalytic effect to the Ti-O, activating the antimicrobial properties of this. A smaller amount of silver has a greater catalyst effect⁽³⁴⁾.

Silver ion implantation over 5×10^{16} Ag has shown no statistically significant reduction in bacterial adhesion.

When comparing all modifications that incorporate silver and those which don't, Ag-Cu-Mn-O and Cu-Mn-O have showed a lower bacterial adhesion to the collection strains and clinical isolates. This is due to the presence of copper,

as noble metals have antimicrobial properties⁽³⁵⁾. We also found that Ag-Cu-Mn-O is the modification that releases the highest amount of silver.

For clinical strains, with the exception of silver islands and the combination of silver and Ti-O, the incorporation of this ion has produced a statistical increase in the percentage of dead bacteria with respect to the unmodified material.

The addition of silver to the modified material has caused an increase of the bactericidal effect except when we compare with Ti-O and YSZ.

For most clinical strains incorporating more silver to TiO-lowAg or 5×10^{16} Ag did not increase the bactericidal effect.

As silver bactericidal mechanism has the cysteine residues as target, and they are present in all proteins, silver is effective against a broad spectrum of bacteria and bacteria are unlikely to develop resistance to silver^(24, 36).

At the moment, the toxic effects of silver, such as the " argiria " which can turn gray or bluish gray parts of the skin or body tissues, the ocular argyrosis, gastroenteritis and fever, have not been associated with silver coatings of endoprotheses⁽³⁷⁻³⁸⁾.

6. CONCLUSIONS

1. Both the collection strains and clinical isolates have shown lower bacterial adhesion to materials modified with respect to the alloy Ti-6Al-4V, except for the modification of Ti-O. In the latter case, a low concentration of silver had a better catalytic effect and produced a decrease in bacterial adherence. Silver ion implantation over 5×10^{16} Ag has shown no statistically significant reduction in bacterial adhesion.
2. The alloy Cu-Mn-O is the modification without silver which has shown less bacterial adherence, and Ti-O has shown the highest bacterial adhesion.
3. Modifications with Cu-Mn-O and Ti-O do not have produced an increase in the percentage of dead bacteria when compared with Ti-6Al-4V. DLC is the modification without silver which has shown a greater bactericidal effect and Cu-Mn-O the least.
4. Among the modifications with silver, Ag-Cu-Mn-O and Ti-O with different silver concentrations did not show an increased bactericidal effect with respect to Ti-6Al-4V. However DLC-Ag, the silver ion-implanted and YSZ-Ag showed this effect. DLC-Ag is the modification with a higher bactericidal effect. 1×10^{16} and TiO-lowAg showed the lowest percentage of dead bacteria.
5. There was a wide variability in the behavior of different clinical strains in relation to adhesion and bactericidal capacity of modifications analyzed ,

demonstrating the need to study these organisms in order to obtain valid conclusions for most cases.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. PROCESO PATOGENICO	2
2. EL PAPEL DE LAS PROPIEDADES BACTERIANAS EN LA ADHESIÓN	4
2.1 Estructuras bacterianas	4
2.1.1. Las fimbrias, flagelos y pilis	4
2.1.2. Alginato	5
2.1.3. Los lipopolisacáridos y componentes de la pared celular	5
2.1.4. Adhesinas	6
2.2 Hidrofobicidad bacteriana	7
2.3 Carga superficial bacteriana	8
3. EL PAPEL DE LAS PROPIEDADES DEL BIOMATERIAL	8
3.1 Composición química superficial	9
3.1.1. Aleaciones metálicas y superficies metálicas puras	9
3.1.2. Sustratos poliméricos	10
3.1.3. Biocerámicas	10
3.2 La morfología y rugosidad superficial	11
3.3 La hidrofobicidad e hidrofilidad	12
3.4 Características del medio y acondicionamiento de la película	12
4. PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN DE UN BIOMATERIAL	13
5. EL PAPEL DE LA PLATA COMO AGENTE ANTIBACTERIANO	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	21
1. BACTERIAS EMPLEADAS	22
2. METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO DE ADHERENCIA	22
3. METODOLOGÍA DE LOS MATERIALES	23
3.1 Islas de plata	23
3.2 DLC con plata	23
3.3 Ti-O con plata	24
3.4 Plata implantada iónicamente	25
3.5 Zirconia cúbica estabilizada con itrio (YSZ) dopada con plata	25
4. ESTADÍSTICA	26
RESULTADOS	27
1. RESULTADOS DE ADHERENCIA BACTERIANA	28
1.1 Resultados de adherencia bacteriana de cepas de colección	28
1.1.1. Islas de plata	29

1.1.2.	<i>DLC con plata</i>	30
1.1.3.	<i>Ti-O con plata</i>	31
1.1.4.	<i>Plata implantada iónicamente</i>	33
1.1.5.	<i>YSZ con plata</i>	34
1.2	Resultados de adherencia bacteriana de cepas clínicas	38
1.2.1.	<i>Islas de plata</i>	39
1.2.2.	<i>DLC con plata</i>	43
1.2.3.	<i>Ti-O con plata</i>	47
1.2.4.	<i>Plata implantada iónicamente</i>	51
1.2.5.	<i>YSZ con plata</i>	55
2.	PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS ADHERIDAS	59
2.1	Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas de colección	59
2.1.1.	<i>Islas de plata</i>	60
2.1.2.	<i>DLC con plata</i>	61
2.1.3.	<i>Ti-O con plata</i>	62
2.1.4.	<i>Plata implantada iónicamente</i>	63
2.1.5.	<i>YSZ con plata</i>	64
2.2	Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas clínicas	65
2.2.1.	<i>Islas de plata</i>	66
2.2.2.	<i>DLC con plata</i>	70
2.2.3.	<i>Ti-O con plata</i>	74
2.2.4.	<i>Plata implantada iónicamente</i>	78
2.2.5.	<i>YSZ con plata</i>	82
3.	ADHERENCIA BACTERIANA PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS SIN PLATA	86
3.1	Adherencia bacteriana de cepas de colección para los materiales modificados sin plata	86
3.2	Adherencia bacteriana de las cepas clínicas para los materiales modificados sin plata	87
4.	PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS ADHERIDAS PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS SIN PLATA	89
4.1	Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas de colección para los materiales modificados sin plata	89
4.2	Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas clínicas para los materiales modificados sin plata	90
5.	ADHERENCIA BACTERIANA PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS CON PLATA	92
5.1	Adherencia bacteriana de las cepas de colección para los materiales modificados con plata	92
5.2	Adherencia bacteriana de las cepas clínicas para los materiales modificados con plata	94
6.	PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS ADHERIDAS PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS CON PLATA	98
6.1	Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas de colección para los materiales modificados con plata	98
6.2	Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas clínicas para los materiales modificados con plata	99

7. ANÁLISIS DE LIBERACIÓN DE PLATA.....	103
DISCUSIÓN.....	104
1. MODIFICACIONES DE SUPERFICIE.....	106
1.1 Islas de plata.....	106
1.2 DLC con plata.....	107
1.3 Ti-O con plata.....	108
1.4 Plata implantada iónicamente.....	110
1.5 YSZ con plata.....	110
2. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO DE ADHERENCIA.....	111
3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA PLATA.....	112
4. TOXICIDAD DE LA PLATA.....	114
CONCLUSIONES.....	116
BIBLIOGRAFÍA.....	118
ANEXOS.....	130

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, un gran número de pacientes han mejorado su situación clínica gracias al uso de biomateriales, en particular gracias al empleo de distintos tipos de prótesis. Sin embargo, la infección relacionada con dichos biomateriales es un problema emergente entre estos pacientes^(17, 24, 32, 39). De hecho, las infecciones quirúrgicas son una de las infecciones más frecuentes en los pacientes hospitalizados, ocupando el segundo lugar entre todas las infecciones nosocomiales⁽⁴⁰⁾, y estas infecciones tienen como factor patogénico común en la mayoría de los casos la presencia de un biomaterial, que puede ser el factor esencial para el desarrollo de la enfermedad, siendo estas cada vez de mayor importancia en términos de mortalidad, morbilidad, y costes⁽⁴¹⁾. Esto es debido a que conllevan largas estancias en el hospital, tratamientos prolongados, múltiples cirugías con graves consecuencias y en algunos casos la infección puede ser la causa real de la muerte del paciente^(19, 31, 42). Este es un problema de importancia cada vez mayor, ya que se espera que el uso de prótesis aumentará en los próximos años, y por lo tanto el número de pacientes infectados también aumentará en paralelo. La prevención de este tipo de infecciones es, por lo tanto, un tema de especial interés que requiere nuevas investigaciones durante los próximos años.

1. PROCESO PATOGENICO

Para el desarrollo de este tipo de investigación, se requiere un conocimiento sobre el proceso infeccioso que tiene lugar. Respecto a este tema, la teoría de Gristina et al⁽⁴³⁾ es una de las claves para el conocimiento del proceso patogénico. Esta teoría se define como "la carrera por la superficie". De acuerdo con esta teoría, cuando se coloca una prótesis en un paciente, se inicia una carrera entre las bacterias y las células del huésped con el fin de alcanzar y colonizar la superficie del biomaterial. Si las bacterias ganan, comienzan a multiplicarse y a desarrollar una estructura, que se conoce como biopelícula, y que impide la integración del biomaterial⁽⁴⁴⁾.

Una biopelícula bacteriana es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y envueltos por una matriz compuesta por moléculas sintetizadas por el propio microorganismo y otras procedentes del huésped, que conforman una estructura tridimensional con una organización espacial compleja⁽⁴⁵⁾.

El desarrollo de la biopelícula en la superficie de un biomaterial se trata de un fenómeno complejo que clásicamente se puede dividir en dos fases⁽³⁻⁴⁾. Una fase inicial física, instantánea y reversible (primera fase) y una fase molecular y celular, función del tiempo e irreversible (segunda fase)^(3, 5-6). Este proceso lo podemos ver esquematizado en la figura 1.

En la fase inicial de la adherencia, las bacterias planctónicas llegan a la superficie del biomaterial utilizando interacciones físicas de largo alcance⁽⁷⁾. Estas son diferentes tipos de fuerzas físicas que afectan a distancias superiores a 100 nm, como por ejemplo el movimiento browniano, hidrofobicidad, fuerzas de Van der Waals y otras. Cuando las bacterias están

en la superficie comienza la segunda fase, en la que las reacciones moleculares entre la superficie bacteriana y la superficie del sustrato son las fuerzas predominantes. Las fuerzas de interacción de corto alcance comienzan asimismo a actuar, incluyendo la atracción iónica, el desarrollo de enlaces covalentes y fuerzas hidrofóbicas⁽⁸⁻⁹⁾. Una vez adheridas las bacterias comienzan a producir una matriz polimérica extracelular (MPE) que adhiere a los organismos entre si y con más fuerza a la propia superficie del material. Se forma la biopelícula bacteriana y aparece el cuadro infeccioso cuando el organismo reacciona contra la biopelícula.

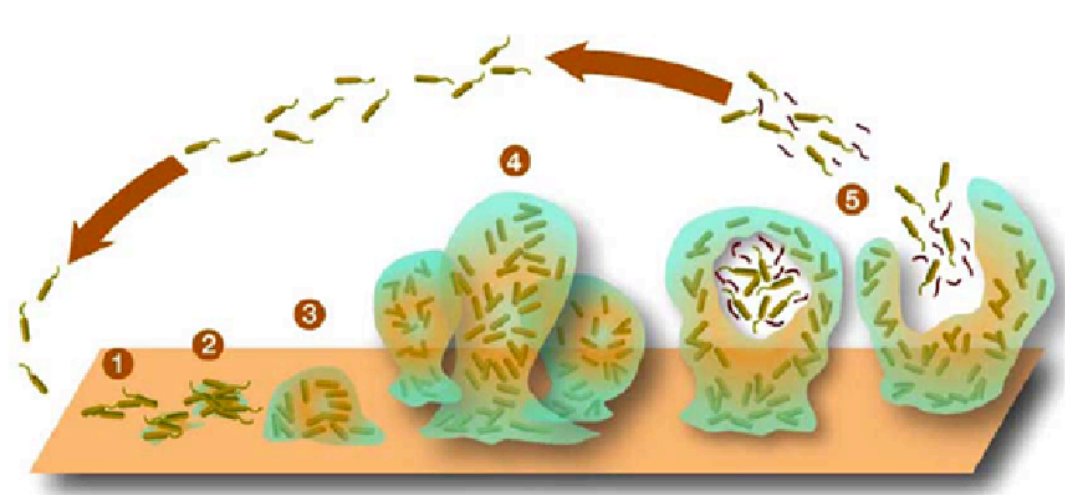


Figura 1: El ciclo de vida de la biopelícula, tomada de Montana State University Center for Biofilm Engineering⁽⁴⁶⁾. 1: adherencia de las células planctónicas a la superficie. 2: producción de la MPE (el proceso se vuelve irreversible). 3 y 4: Desarrollo de la biopelícula. 5: desprendimiento de células planctónicas de la biopelícula al medio.

La adherencia bacteriana a una superficie está determinada por la combinación de interacciones entre la superficie bacteriana, la superficie del sustrato y el medio ambiente que los rodea. Depende en gran medida de la estructura atómica y la composición de la superficie de los biomateriales implantados, carga de la superficie, hidrofobicidad, así como la rugosidad y / o morfología^(4, 14-15).

Sin embargo, el trabajo reciente de Henk et al⁽⁴⁷⁾ ha cambiado la visión del proceso de adhesión, describiendo tres tipos de fuerzas de adhesión que explicarían de forma más detallada el fenómeno de adhesión: régimen letal, régimen planctónico y régimen de interacción. De acuerdo con esta teoría, la adherencia se inicia con un "régimen planctónico", caracterizado por débiles fuerzas de adhesión, y en el que las bacterias no cambian su fenotipo. Este régimen es seguido por el "régimen de interacción", en el que las bacterias fortalecen su unión con la superficie mediante la formación de la biopelícula. En este régimen tiene lugar los cambios fenotípicos que caracterizan a las formas sesiles. Los autores explican que las fuerzas de adhesión tienden a aumentar durante los primeros minutos después del contacto, cambiando de reversibles a irreversibles. Por último, el "régimen letal" se caracteriza por una fuerte adhesión. Las fuerzas implicadas en esta fase estarían relacionadas con las

cargas de las superficies bacterianas y del material. Las bacterias por lo general poseen una carga superficial negativa, que interactúa con superficies cargadas positivamente. Estas superficies cargadas positivamente al interactuar con las bacterias pueden llegar a tener un efecto letal sobre las mismas. Todas estas fases están influenciadas por la naturaleza bacteriana y del biomaterial.

El desarrollo de la biopelícula bacteriana complica además el diagnóstico y tratamiento de las infecciones protésicas, ya que permite que las bacterias resistan a los agentes antimicrobianos, a la respuesta inmunitaria y evita la integración del biomaterial (porque las células no pueden cubrir el implante), y posteriormente aparece la infección⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. Los pacientes con este tipo de infección requieren un período más largo de terapia con antibióticos y, en la mayoría de los casos, un tratamiento quirúrgico que suele implicar la retirada del material, particularmente complejo en el caso de las infecciones de prótesis osteoarticulares^(16, 39).

Por lo tanto, se puede argumentar que la prevención de la adhesión bacteriana sin el uso de antibióticos puede ser uno de los caminos más eficaces de reducir las infecciones de implantes ortopédicos⁽¹⁶⁻¹⁷⁾. Debido a que no podemos actuar sobre las propiedades bacterianas, la investigación acerca de la prevención de la infección de biomateriales se centra en el desarrollo de nuevos biomateriales y la modificación de los ya existentes con el objetivo de que sean menos propensos a la adherencia bacteriana, que puede conducir al desarrollo de biopelícula⁽¹⁸⁻²¹⁾.

2. EL PAPEL DE LAS PROPIEDADES BACTERIANAS EN LA ADHESIÓN

Los principales mecanismos relacionados con la adhesión bacteriana se han estudiado durante años. Varias propiedades bacterianas han demostrado su implicación en el proceso de adhesión:

2.1. Estructuras bacterianas

2.1.1. Las fimbrias, flagelos y pilis

Los flagelos, apéndices móviles largos, son considerados como un factor de virulencia, así como un factor relacionado con la formación de la biopelícula, ya que facilita la fijación de la célula bacteriana a la superficie del biomaterial⁽⁵¹⁾.

Las fimbrias parecen estar relacionadas con una adherencia no específica a las superficies abióticas. Estas estructuras bacterianas estabilizan el contacto entre las bacterias y la superficie, interactuando con la superficie después de la primera etapa⁽⁵²⁾.

La presencia de pilis en las bacterias les permite difundir y colonizar otras superficies⁽⁵³⁾. Por otro lado, la presencia de la motilidad por pilis está también estrechamente relacionada con el desarrollo de la biopelícula, como se ha estudiado en el modelo de desarrollo de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*⁽⁵⁴⁾. La adherencia inicial de este microorganismo está mediada por hidrofobinas y/o por adhesinas de superficie tipo lectinas.

O'Toole y Kolter desarrollaron dos mutantes, uno de ellos deficiente en la producción de pili tipo IV y el otro deficiente en la movilidad flagelar, ambos perdieron la capacidad de producir una biocapa. Los pili tipo IV están implicados en un tipo particular de movilidad bacteriana denominada twitching, que tiene lugar mediante la retracción de los pili.⁽⁵⁵⁾ El mutante deficiente en la formación de flagelo se adhiere muy débilmente al soporte, lo que indicaría que el flagelo es importante para la aproximación a la superficie⁽⁵⁶⁾.

Las bacterias grampositivas pueden también presentar estructuras parecidas a las fimbrias de las bacterias gramnegativas, sin embargo, estas estructuras no parecen desempeñar un papel importante en la adherencia.

2.1.2. Alginato

La producción del exopolisacárido alginato por *Pseudomonas aeruginosa* se relaciona con la capacidad de adherirse a las superficies sólidas, y se sabe que existen diferentes niveles de expresión genética de alginato dentro de las células adheridas⁽⁵⁷⁾.

2.1.3. Los lipopolisacáridos y componentes de la pared celular

Los lipopolisacáridos (LPS) son uno de los principales componentes de las membranas externas de las bacterias gram-negativas, proporcionando integridad a las mismas, y en muchos casos, son las moléculas que interactúan con las superficies. El papel de los LPS en la formación de biopelículas en las superficies bióticas y abióticas está relacionado con un aumento de la hidrofobicidad. Los LPS en las bacterias Gram-negativas están constituidos por diferentes estructuras: El lípido A, la porción hidrófoba (que es el principal factor de virulencia de los LPS), el antígeno O y el núcleo oligosacárido (núcleo OS). Los resultados obtenidos por Nakao et al en un mutante de *Escherichia coli*⁽⁵⁸⁾ demostraron que algunos componentes de los LPS, como el núcleo OS, podrían afectar a la formación de la biopelícula y están estrechamente relacionados con eDNA. La presencia de eDNA en la MPE de una biopelícula también podría desempeñar un papel en la adhesión bacteriana y la agregación, así como en el desarrollo de la biopelícula⁽⁵⁸⁾.

La presencia de peptidoglicanos, lipopéptidos y ácidos lipoteicoicos en la superficie de *S. epidermidis* y *S. aureus* son algunos de los mecanismos de protección de estas bacterias contra los mecanismos de defensa del huésped

⁽⁵⁹⁾. Para *P. aeruginosa*, la presencia de los LPS en la superficie estimula la respuesta antigénica dentro del cuerpo humano⁽⁶⁰⁾.

2.1.4. Adhesinas

De manera genérica las estructuras bacterianas que median el proceso de adherencia reciben el nombre de adhesinas.

Las adhesinas representan un grupo importante de factores de virulencia mediando en las interacciones entre la superficie de las células microbianas, las células del huésped y la matriz extracelular (MEC).

En la primera fase del desarrollo de la biopelícula, las adhesinas permiten el anclaje estable a las superficies⁽⁶¹⁾. Estas estructuras se unen a las proteínas adsorbidas en la superficie del implante⁽⁶²⁾. La primera etapa está mediada por los componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMM), que interactúan con las células del huésped y las proteínas de la MEC. Normalmente, la proteína localizada en el extremo de la fimbria es la adhesina propiamente dicha que se adhiere a un receptor de la célula huésped constituido por regla general por residuos de hidratos de carbono de glucoproteínas o glucolípidos. Ocasionalmente, la propia proteína mayoritaria de la fimbria actúa como adhesina. El ensamblaje de la fimbria en la superficie huésped es un proceso complejo en el cual intervienen una serie de proteínas auxiliares.

Ciertas bacterias gramnegativas poseen proteínas localizadas en la membrana externa que tienen un papel importante en la adherencia, se trata de las denominadas adhesinas afimbriadas.

Hasta la actualidad se han definido tres tipos principales de interacción adhesina-receptor:

- Lectina-hidrato de carbono (ejemplo, la fimbria tipo 1 de *E. coli* y la célula epitelial de la vejiga urinaria).
- Proteína-proteína (ejemplo, proteína F de *Streptococcus pyogenes* y fibronectina de la célula del epitelio respiratorio).
- Hidrofobina-proteína (ejemplo, el ácido lipoteicoico y la fibronectina)⁽⁶³⁾. En el segundo paso, la acumulación y agregación bacteriana se convierte en el fenómeno predominante⁽⁵⁹⁾. La adhesión intercelular es debido a la producción del polisacárido intercelular de adhesión (PIA)⁽⁶⁴⁾.

Para *S. aureus* y *S. epidermidis* estas adhesinas son parte de una familia, que median en la adhesión a varios tipos de células huésped o superficies de materiales cubiertos de una matriz de proteínas. La fibronectina es una proteína relacionada por lo general con un aumento de la fijación bacteriana debido al hecho de que hay algunas bacterias con adhesinas específicas para la fibronectina. Por ejemplo, *S. aureus* tiene dos adhesinas para la fibronectina: proteína de unión a fibronectina A (FnBPA) y proteína de

unión a fibronectina B (FnBPB). Estas adhesinas tienen diferentes ligandos tales como la fibronectina, la elastina y el fibrinógeno para FnBPA, y la fibronectina y elastina para FnBPB⁽⁶¹⁾. Existen adhesinas que se unen al colágeno, como la Proteína de Unión a Colágeno (CNA) y adhesinas que promueven la activación de la sangre y agregación plaquetaria y la aglutinación como el factor de aglutinación A (ClfA) y el factor de aglutinación B (ClfB). Entre ClfA y ClfB existen algunas diferencias en ligandos. ClfA tiene fibrinógeno y factor de complemento I como ligandos principales, mientras que ClfB tiene fibrinógeno, citoqueratina 10 y citoqueratina 8⁽⁶¹⁾. En *S. aureus*, la autolisina que está participando en la primera fase es AtLA, altamente homóloga con la autolisina de *S. epidermidis* llamada AtLE.

Para *S. epidermidis*, la principal autolisina / adhesina es AtLE. Diferentes estudios mostraron que un mutante de AtLE, defectuoso en la formación de biopelícula, es menos hidrófobo y forma grupos de células más grandes en comparación con la de tipo salvaje⁽⁶¹⁻⁶²⁾. La proteína de unión de la matriz extracelular (Embp) también está implicada en las fases de adhesión y acumulación en la formación de biopelícula⁽⁵⁹⁾. Para esta especie los MSCRAMMs que se unen con el fibrinógeno son SdrG / Fbe, y con la fibronectina Embp. Sin embargo, otros MSCRAMM (AtIE y AaE) no se unen covalentemente a fibronectina⁽⁵⁹⁾.

Para *S. aureus* y *S. epidermidis* hay otras proteínas de la superficie, incluyendo la proteína asociada a la biopelícula (BAP) y la proteína asociada a la acumulación (AAP), que son importantes en la formación de biopelículas. Para *S. epidermidis*, AAP es una proteína extracelular esencial en el proceso de acumulación a las superficies. Es importante remarcar que AAP necesita procesamiento proteolítico con el fin de obtener la forma biopelícula-activa⁽⁵⁹⁾.

Otra molécula, el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) o poli N-acetil glucosamina (PNAG) está relacionada con las biopelículas fuertes^(59, 65). La expresión del PIA está regulada por el operón *icaADBC*. Tanto *S. epidermidis* como *S. aureus* presentan este locus aunque no todas las cepas⁽³²⁾. La expresión del operón *ica* es dependiente de las condiciones ambientales⁽⁶¹⁾.

La densidad bacteriana en la formación de biopelículas es regulada por otro sistema. Por ejemplo, entre las especies de estafilococos el sistema de regulación es el locus *agr*. Se activa durante la transición entre el crecimiento exponencial y las fases estacionarias de crecimiento utilizando un mecanismo auto-regulador que implica un péptido feromona modificado que indica la densidad celular⁽⁶¹⁾.

2.2. Hidrofobicidad bacteriana

Existen diferentes estructuras en la superficie bacteriana que podrían influir en la hidrofobicidad bacteriana, y, por tanto, influir en la adherencia, ya que se sabe que las bacterias con propiedades hidrofóbicas tienden a adherirse a superficies hidrofóbicas, mientras que las bacterias con propiedades hidrofílicas tienden a adherirse a superficies hidrofílicas.

Los polisacáridos y proteínas que forman la cápsula juegan un papel importante en esta propiedad⁽³⁾. Mientras que las cápsulas hidrofílicas reducen la adhesión, se ha demostrado que la hidrofobicidad de la superficie del material tiene más influencia que la hidrofobicidad de la superficie bacteriana⁽⁴⁾. Las adhesinas y subunidades adhesivas asociadas con fimbrias podrían estar también involucradas en la hidrofobicidad. El papel importante de la hidrofobicidad bacteriana puede ser modificado por la presencia de diferentes tipos de fimbrias en la superficie bacteriana⁽⁴⁾.

2.3. Carga superficial bacteriana

La importancia de la carga de la superficie bacteriana es otro tema interesante pero todavía no se entiende claramente. Se sabe que las bacterias en suspensión acuosa, así como otras partículas, son ionizadas y en su mayoría poseen carga negativa^(3, 62). Sin embargo, la adhesión a la superficie de un material parece ser que no se ve afectada de manera significativa por el tipo o el grado de la carga de la superficie bacteriana.

3. EL PAPEL DE LAS PROPIEDADES DEL BIOMATERIAL

Es bien sabido que la presencia de una prótesis da lugar a un aumento de la susceptibilidad a la infección por parte del paciente⁽¹⁻²⁾. También reduce el número de bacterias necesarias para producir la infección⁽⁶⁶⁾. Así, en un estudio realizado con ratas con vías biliares ocluidas se obtuvo una evidencia ultraestructural de la colonización bacteriana y la formación de biopelículas en las superficies de la mucosa biliar sólo en aquellos animales en los que había implantes biliares permanentes⁽⁸⁾.

En este sentido, los datos epidemiológicos obtenidos en humanos, demuestran que las infecciones más significativas adquiridas en el hospital, de acuerdo con la frecuencia y potencial gravedad de las mismas, son aquellas relacionadas con la cirugía y dispositivos médicos (tabla 1)

Dispositivo médico	Frecuencia de infección
Prótesis ortopédicas	2-5% ^(24, 66)
Prótesis de pared abdominal	1-18% ⁽⁶⁷⁻⁶⁸⁾
Prótesis craneales	3,8-7,9% ⁽⁶⁹⁻⁷⁰⁾
Marcapasos	1-7% ^(3, 8, 71)
Prótesis vasculares	1-5% ^(3, 8, 71)
Lentes interoculares	0,13% ^(3, 71)
Drenajes ventriculares externos	6-15% ⁽⁶⁶⁾

Tabla 1. Tipos y frecuencia de infecciones relacionadas con biomateriales^(3, 8, 67-68, 71)

El análisis cuidadoso de los datos sobre adherencia bacteriana y modificación superficial de biomateriales permite establecer los siguientes cinco principios:

- (1) Diferentes bacterias pueden adherirse de manera diferente al mismo biomaterial.
- (2) La misma bacteria pueden adherirse de manera diferente a diferentes biomateriales.
- (3) La misma bacteria pueden adherirse de manera diferente al mismo biomaterial que se coloca en circunstancias diferentes, incluyendo el medio en el que se coloca el dispositivo (medio hidrofóbico frente a hidrofílico), el tipo de flujo (dinámico o fijo) y la temperatura.
- (4) La inhibición *in vitro* de la colonización bacteriana del biomaterial no asegura la eficacia para evitar la infección *in vivo*.
- (5) El beneficio clínico de la modificación de una superficie en particular puede variar de una aplicación a otra.

Teniendo en cuenta estos 5 principios, los factores que influyen en la adhesión bacteriana a la superficie de un biomaterial incluyen la composición química del material, carga superficial, hidrofobicidad y rugosidad de la superficie o configuración física. Además, su energía superficial, sitios de unión vacíos, y las características hidrofóbicas e hidrofílicas pueden alterarse rápidamente por la adsorción o unión de proteínas del huésped o tras la formación de biopelículas^(2, 4, 8).

3.1. Composición química superficial

3.1.1. Aleaciones metálicas y superficies metálicas puras

Presentan cortes planos a través de estructuras cristalinas. Estos materiales exhiben generalmente de moderadas a elevadas energías de superficie. Son por lo tanto reactivos y potencialmente capaces de catalizar reacciones químicas con moléculas glicoproteicas de la biopelícula y, posiblemente, directamente con la superficie de las células bacterianas. El titanio y las aleaciones de cromo-cobalto permiten una integración con las células del tejido más fuerte que los polímeros o biovidrios⁽¹¹⁾.

El titanio puro o aleaciones de este se usan frecuentemente en cirugía ortopédica debido a su resistencia a la corrosión, buena biocompatibilidad, propiedades mecánicas y baja toxicidad⁽³⁹⁾. La formación de una delgada película de óxido de titanio (Ti-O) es responsable de su biocompatibilidad⁽⁷²⁻⁷³⁾. Por estas razones Ti es el metal de elección en multitud de localizaciones para fabricar una prótesis (implantes dentales, prótesis ortopédicas, prótesis de

pared abdominal...). Por consiguiente, el desarrollo de nuevos métodos para la inhibición de la colonización bacteriana en titanio, y por lo tanto reducir la aparición de la infección, es un reto que proporcionaría un mejor rendimiento de las prótesis⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾.

Las aleaciones de cromo-cobalto y el acero inoxidable también son ampliamente usadas en los implantes ortopédicos. En estos materiales, los iones metálicos (tales como Fe^{3+} , Mg^{2+} , Cr^{2+} , y Co^{3+}) están disponibles en trazas o incluso en cantidades mayores, especialmente después de la corrosión, y pueden servir como cofactores para las enzimas que participan en el metabolismo de las proteínas, azúcares y en la replicación del ADN⁽¹¹⁾.

3.1.2. Sustratos poliméricos

La mayoría de los polímeros de uso médico son materiales amorfos. No son tan complejos como las superficies de energía más alta, tales como metales o materiales cerámicos, pero son de relevancia biológica. Los polímeros se emplean como biomateriales debido a sus propiedades físico-químicas con una amplia variedad de aplicaciones: polipropileno para suturas, prótesis de pared abdominal y lentes intraoculares (LIO); polimetil-metacrilato (PMMA) o polietileno lineal de alta densidad modificado en craneoplastias⁽⁶⁹⁻⁷⁰⁾, silicona en dispositivos de drenaje biliar, cirugía estética y cirugía ortopédica⁽¹⁾; Plastipore (polietileno de alta densidad) y Proplast (compuesto de politetrafluoroetileno y de fibra de carbono) en la fabricación de prótesis de reemplazo osicular⁽⁷⁷⁾; polietileno de ultra-elevado peso molecular (UHMWPE) en prótesis ortopédicas⁽²⁾. En la fabricación de mallas quirúrgicas absorbibles se emplean poliglactina 910 (PG910) o ácido poliglicólico (PGA)⁽⁷⁸⁾, que se combinan para reducir las necesidades de material de malla mientras se conserva la resistencia requerida dando lugar a mallas compuestas, en las que los materiales absorbibles y no absorbibles están combinados⁽⁷⁸⁾.

El sustrato polimérico puede mostrar carácter ácido o básico (de acuerdo con la definición de Lewis) gracias a la presencia de elementos que se comportan como aceptores o donadores de electrones. La adhesión de *E. coli* ha sido investigada en polímeros con diferentes características ácido / base: cloruro de polivinilo (PVC) es ácido, polimetilmetacrilato (PMMA) es alcalino, polietileno de baja densidad (LDPE) es anfótero. El carácter básico de la pared celular de *E. coli* (carga negativa y carácter hidrofílico) interactuaría preferentemente con un compuesto ácido, representado en este caso por la superficie de PVC, seguido de polietileno de baja densidad y, finalmente, de PMMA⁽⁷⁹⁾.

3.1.3. Biocerámicas

A menudo se implantan como sustitutos de hueso debido a su comportamiento osteoinductivo, promoviendo la curación del hueso, la regeneración del mismo, o ambos. En los últimos años, los pacientes se están beneficiando del desarrollo de unos materiales de mayor calidad y más estéticos, como los materiales cerámicos en la restauración dental⁽⁸⁰⁾. Los materiales cerámicos de hidroxiapatita (HA) y fosfato de calcio bifásico (BCP)

se emplean también como sustitutos de hueso debido a su estructura porosa ^(2, 11).

La cerámica de zirconia (ZrO_2) ha mostrado mejoras considerables sobre los materiales existentes en varias áreas clave relacionadas con la longevidad de los componentes, incluida la resistencia, la rugosidad, reducción del desgaste, el comportamiento de fricción y biocompatibilidad⁽⁸¹⁾. Se utiliza en cerámicas dentales para restauraciones estéticas⁽⁸²⁾. ZrO_2 es un óxido metálico anfótero que exhibe propiedades de intercambio de aniones y de cationes, dependiendo del pH y la composición del tampón⁽⁸³⁾.

La HA es también anfótero⁽⁸⁴⁾, pero tiene una carga neta negativa, porque hay más grupos fosfato que átomos de calcio expuestos. Incluso a pesar de que el Ti es un metal, la HA se encuentra revestida por una capa de óxido en la superficie, principalmente como dióxido de titanio, que tiene características físicas / químicas más estrechamente relacionados con la cerámica que con los metales⁽⁸⁵⁾. Estas características explican, en parte, el comportamiento similar entre Ti, ZrO_2 , y las superficies de HA con respecto a la unión a proteínas: En estudios de adherencia, las superficies de Ti y ZrO_2 presentaron un número similar de células bacterianas adheridas, probablemente debido a las propiedades físico / químicas comparables entre ZrO_2 y superficies de dióxido de titanio; y el número de células adheridas de *S. mutans* a Ti sin recubrimiento y ZrO_2 fue significativamente mayor que a la superficie de HA sin recubrir⁽⁸⁵⁾.

Sin embargo, a pesar de las diferencias in vitro detectadas en muchos estudios, no se detectó ninguna diferencia en las tasas de infección entre los materiales implantados (autoinjerto, aloinjerto, injertos óseos criopreservados, PMMA, vitalium, resina formada durante la operación y resina prefabricada) ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Además, el material de implante ha presentado efectos variables sobre la tasa de infecciones en craneoplastia^(69, 74-75). En un estudio reciente en el que se empleó sonicación de los implantes y cuantificación bacteriana de prótesis ortopédicas infectadas no se encontraron diferencias entre los materiales utilizados⁽⁸⁹⁾.

3.2. La morfología y rugosidad superficial

Las irregularidades de las superficies poliméricas, el diámetro de las hebras y las mallas de multifilamentos facilitan la adhesión bacteriana y la deposición de biopelícula^(78, 90). Por ejemplo, cuando los implantes metálicos con una microrrugosidad estándar (tales como titanio y aleaciones de titanio), o polímeros (UHMWPE) se comparan con variantes más lisas, a menudo hay una disminución significativa en la adhesión bacteriana en éstas últimas superficies cuando el grado de rugosidad de la superficie es de una escala más pequeña que el tamaño de las bacterias contaminantes⁽²⁾. Esto puede deberse a que las superficies rugosas tienen una mayor área superficial y las depresiones en las superficies rugosas proporcionan más sitios favorables para la colonización⁽³⁾. Sin embargo, no hay una dependencia lineal de la adhesión bacteriana y el grado de rugosidad de la superficie⁽⁹¹⁾. En este sentido, una vez que las bacterias se han adherido a la superficie del biomaterial, se ha

demostrado que la expresión del locus *ica* no se ve afectada por el sustrato sobre el cual se forma la biopelícula, como se observó para los polímeros y metales, incluyendo el acero inoxidable y titanio para distintas topografías⁽²⁾.

Cordero et al. investigaron las diferencias entre las aleaciones de cobalto-cromo-molibdeno (Co-Cr-Mo) y de titanio-aluminio-vanadio (Ti-6Al-4V), ya sea con una superficie lisa pulida o un recubrimiento microporoso. En ambos materiales, las superficies porosas requieren significativamente menos bacterias para provocar una infección en el hueso en un modelo experimental⁽¹⁰⁾.

En otros modelos, la tasa de infección con suturas de multifilamento (o materiales porosos) es mayor que con las suturas de monofilamento (o materiales sólidos) y este hecho podría atribuirse a que las superficies porosas proporcionan un lugar para que las bacterias contaminantes se multipliquen y estén protegidos del sistema inmune del huésped^(3, 10, 92).

3.3. La hidrofobicidad e hidrofiliidad

Dependiendo de la hidrofobicidad de las bacterias y la superficie del material, las bacterias se adhieren de forma diferente a los materiales. En general, los materiales hidrofílicos son más resistentes a la adherencia bacteriana que los materiales hidrofóbicos⁽⁹³⁻⁹⁴⁾. A través del enfoque de van Oss se puede obtener un valor cuantitativo de la hidrofobicidad, expresado en el Sistema Internacional (SI) de unidades. De acuerdo con esta teoría, la hidrofobicidad se define como la energía libre de interacción entre dos entidades (i) cuando se sumerge en agua (W)- ΔG_{iwi} . Si $\Delta G_{iwi} < 0$, existe una mayor tendencia a la interacción entre las entidades (i) en lugar de entre una entidad (i) y agua, y la sustancia (i) se considera hidrofóbica. Por el mismo razonamiento, si $\Delta G_{iwi} > 0$ la sustancia (i) es hidrofílica⁽⁹³⁾.

El ángulo de contacto del agua (WCA) es una buena técnica para la evaluación de la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de una superficie: un alto WCA representa hidrofobicidad y bajo WCA representa hidrofiliidad⁽⁴⁾. Los sustratos hidrofílicos están cargados negativamente (tales como las superficies de vidrio y metal), mientras que polímeros como el teflón, polietileno o poliestireno son hidrofóbicos y están menos cargados electrostáticamente⁽⁷⁸⁾. Las superficies de sustratos recubiertos con proteínas, tales como albúmina, glicoproteína bovina de suero bovino (BSA) o BSA libre de ácidos grasos disminuyen la hidrofobicidad de la superficie, y esto disminuye la adhesión bacteriana⁽⁷⁸⁾.

3.4. Características del medio y acondicionamiento de la película

Las proteínas del suero o tejidos - tales como albúmina, fibronectina, fibrinógeno, laminina, colágeno desnaturalizado y otros - promueven o inhiben la adhesión bacteriana al unirse a la superficie del biomaterial, a la superficie bacteriana, o por estar presentes en el medio líquido durante el periodo de

adhesión. La mayoría de los enlaces entre las bacterias y las proteínas son interacciones ligando-receptor específicas⁽³⁾.

La fibronectina (Fn), promueve claramente la adhesión de *S. aureus* a la superficie del biomaterial⁽⁹⁵⁾. Por el contrario, la albúmina adsorbida en la superficie de un material inhibe la adhesión bacteriana a polímeros, cerámicas y metales⁽⁹⁵⁾. La mayoría de los estudios han demostrado que la adsorción de fibrinógeno por los biomateriales promueve la adherencia bacteriana, especialmente para estafilococos⁽⁹⁵⁾. La trombina aumenta significativamente la adhesión bacteriana ya que polimeriza el fibrinógeno a fibrina en plasma pobre en plaquetas (PPP)⁽⁹⁶⁾. La adherencia de los estafilococos coagulasa negativos (SCN) sobre materiales recubiertos de plasma es mucho menor que en las superficies de control no tratadas⁽⁹⁵⁾. Sin embargo, el PPP con trombina aumenta la adhesión bacteriana. Baumgartner et al. demostraron que las plaquetas aumentan la adhesión de *S. aureus* en comparación a la albúmina humana (HAS) y especialmente en combinación con PPP y trombina⁽⁹⁶⁾.

En un estudio se evaluó el efecto de la adsorción de Fn sobre materiales de caucho utilizados para drenajes biliares y la adhesión de *Escherichia coli* sobre estos materiales recubiertos⁽⁹⁷⁾. En la presencia de plasma completo o bilis, la adsorción de Fn in vitro a la superficie de caucho se vio fuertemente inhibida. La bilis contiene sustancias anfifílicas, que pueden inducir la formación de micelas y bloquear las zonas de unión hidrofóbicas. Sin embargo, a pesar de estos datos, los estudios in vivo demostraron que la bilis no impide la adherencia bacteriana y el posterior desarrollo de la infección⁽⁹⁷⁾.

4. PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN DE UN BIOMATERIAL

Con el objetivo de prevenir la infección, la modificación de las propiedades de los biomateriales es una estrategia ampliamente utilizada, ya que no podemos actuar sobre las bacterias. Una forma de modificar dichas propiedades es recubrir los biomateriales con agentes antimicrobianos⁽⁸⁾. Los materiales que contienen estos agentes pueden ser clasificados en base a su mecanismo de acción:

- (1) Los que unen los agentes antimicrobianos directamente a la superficie de la prótesis y que actúan sólo sobre las bacterias que contactan con la misma, por ejemplo, vancomicina unido covalentemente a titanio⁽⁹⁸⁾.
- (2) Aquellos que liberan el agente antimicrobiano desde el biomaterial implantado, creando una zona bactericida alrededor del implante, por ejemplo, PMMA impregnado de gentamicina⁽⁹⁹⁾.
- (3) Aquellos que liberan agentes antibióticos a partir de una película o recubrimiento sobre el implante, por ejemplo, tubos endotraqueales recubiertos de plata⁽¹⁰⁰⁾, clavos intramedulares

recubiertos con gentamicina⁽¹⁰¹⁾, y catéteres venosos centrales recubiertos con una película de rifampicina-minociclina⁽¹⁰²⁾.

Otra estrategia podría ser el uso de fragmentos de adhesinas y anticuerpos antiadhesina para evitar la adhesión bacteriana. Los fragmentos de adhesina recombinantes causarían la inhibición de la adherencia mediante el bloqueo de sitios de unión en el sustrato, y los anticuerpos bloquean los sitios de unión en la adhesina presente en la superficie bacteriana⁽¹⁰³⁾.

Dickinson et al estudiaron la adherencia de *S. aureus* con diferentes recubrimientos de proteínas en tres nuevos poliuretanos, y Baumgartner et al. analizaron el papel de las proteínas y los componentes celulares de los trombos en la adherencia^(3, 95-96). Dentro de Los poliuretanos que se probaron se incluyen un poliéter-uretano relativamente hidrofóbico-base e ionómeros hidrofílicos análogos del material de base. Estos autores demostraron que las propiedades superficiales del biomaterial pueden ser enmascaradas mediante la presencia de una capa de proteínas adsorbidas⁽⁹⁵⁾.

Una de las estrategias que está ganando impulso en la lucha contra la infección es el uso de nanomateriales antibacterianos (materiales en nanofase con propiedades bactericidas intrínsecas). Los nanomateriales con tamaños menores de 100 nm poseen propiedades únicas (por ejemplo, alta relación superficie-volumen, alta reactividad...) en comparación con sus homólogos estructurados en micras debido principalmente a los efectos de tamaño y de los fenómenos de superficie en la nanoescala. Tales propiedades conducen a diferentes mecanismos antibacterianos entre los que se incluyen:

- (1) La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o iones de metales pesados que dañan las proteínas y el ADN de las bacterias.
- (2) Penetración o interrupción de las membranas celulares por nanopartículas.
- (3) Interrupción de la transducción de electrones.

Recientemente, Kang et al. mostraron una fuerte actividad antimicrobiana de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. El mecanismo propuesto es que el estrés oxidativo tiene efecto sobre la morfología, integridad de la membrana y la actividad metabólica de las bacterias⁽¹⁰⁴⁾.

Se ha detectado que los derivados del fullereno (C60)⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁾, que contienen ciertos péptidos, poseen propiedades antibacterianas hacia *S. aureus* y *E. coli*.

Las propiedades antibacterianas de quitosano, el derivado de N-desacetilado de la quitina, son también conocidas⁽¹⁰⁷⁾. El quitosano es más activo contra hongos y algas, pero también inhibe una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁷⁾.

Los efectos antibacterianos de las cerámicas de vidrio bioactivo también han sido estudiados para una amplia gama de bacterias clínicamente relevantes⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾.

Las nanopartículas de metales y de óxidos de metales se han empleado también dentro de esta estrategia: Plata, flúor, óxido de zinc, óxido de titanio, hierro, óxido de hierro, cobre, alúmina (Al₂O₃), óxido de cobre (CuO), óxido de magnesio (MgO). Especialmente, las nanopartículas de plata han demostrado que poseen un espectro antimicrobiano sin igual, con eficacia contra 150 diferentes patógenos^(23-24, 35).

5. EL PAPEL DE LA PLATA COMO AGENTE ANTIBACTERIANO

Una interesante estrategia para disminuir la adherencia bacteriana es recubrir las prótesis con metales nobles, generalmente plata⁽²²⁾, ya que los compuestos de plata han sido utilizados como agentes antimicrobianos desde hace mucho tiempo.

Ya desde 1000 a.C., eran conocidas las propiedades antimicrobianas de la plata en el agua⁽¹¹¹⁾. Heródoto describe cómo el rey de Persia, cuando se va a la guerra, hervía el agua almacenada en garrafrones de plata⁽³⁶⁾.

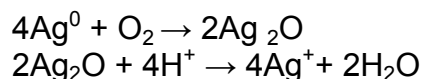
La primera descripción moderna de este efecto fue dada por Raulin en 1869, quien observó que el *Aspergillus niger* no podía crecer en recipientes de plata⁽³⁶⁾. El botánico suizo von Nägeli ideó el término "oligodinámico" para describir la capacidad bactericida débil, pero muy neta, de la mayoría de los metales y en particular de la plata^(36, 111-114).

Las soluciones de plata fueron un remedio popular para el tétanos y el reumatismo en el siglo XIX, y para los resfriados y la gonorrea antes de la llegada de antibióticos en la primera parte del siglo XX. Sin embargo, el interés en las sales de plata en el tratamiento de infecciones en pacientes con quemaduras, desapareció por completo en torno a la Segunda Guerra Mundial^(22, 115) y se tardó muchos años en recuperar el interés en la plata para esta aplicación. Este se reavivó gracias a una publicación de Moyer et al⁽²²⁾. En la actualidad, la plata ha resurgido como un tratamiento viable y es una opción para las infecciones localizadas en quemaduras, heridas abiertas, y úlceras crónicas.

Hoy en día, con la llegada de los nanomateriales, se han propuesto diferentes tipos de nanopartículas de plata (AGNPS) y nanocompuestos que contienen plata para tratar de combatir la formación de biopelículas. La plata, ya sea en la forma de iones o AGNPS, tiene un amplio espectro bactericida y no tiene los problemas de resistencia que presentan algunos antibióticos⁽⁷²⁾. Por otra parte, la plata y sus compuestos son eficaces contra virus y hongos. Por lo tanto, el uso de AGNPS o de otras especies de plata adsorbidas en la

superficie de los biomateriales o implantadas en su interior de forma iónica podría ser una estrategia válida para disminuir la incidencia de infecciones⁽¹¹⁶⁾.

Para que la plata sea biológicamente activa, debe estar en forma soluble tal como Ag^+ , en la figura 2 vemos un esquema de este proceso⁽²⁹⁾. La plata elemental requiere su ionización para tener eficacia antimicrobiana. Ag^0 es la forma metálica o sin carga de la plata es el estado en el que se encuentra cuando está en forma de nanocristales. Las nanopartículas de plata se oxidan en medio acuoso expuesto al aire, resultando la liberación de iones de plata dependiendo de la acidez del medio.



El ion de plata es una especie altamente reactiva, de fácil unión a proteínas cargadas negativamente, ARN, ADN e iones cloruro. Estudios previos han demostrado que los iones de plata reaccionan con grupos donantes de electrones (N, O, o S), que están presentes en las bacterias como imidazol, amino, fosfato, grupos carboxilo o tiol en las proteínas o en ADN^(22, 24). En un estudio de Gordon et al se encontró que los grupos tiol son los que tienen mayor afinidad por los iones de plata. Otros componentes proteicos de las bacterias ofrecen sin embargo mayor resistencia. La interacción con los grupos sulfhidrilo (tiol) de aminoácidos, parece jugar un papel esencial en la inactivación de enzimas bacterianas al promover la liberación de hierro con la subsiguiente formación de radicales hidroxilo por un mecanismo indirecto probablemente mediada por especies reactivas del oxígeno.

Aunque no está claro si esto por sí solo explica el desacoplamiento de la cadena respiratoria de la fosforilación oxidativa y el colapso de la fuerza protón-motriz (PMF) en la membrana citoplasmática⁽²⁴⁾. Pequeñas concentraciones de iones de plata son suficientes para que exista actividad microbicidas⁽²³⁾. Los iones de metales como Cu^{2+} y Ag^+ son además lo suficientemente pequeños como para romper las membranas celulares de las bacterias y conseguir entrar con el fin de alterar la función enzimática. Estos iones desplazan otros cationes, que son necesarios para que tengan lugar las reacciones enzimáticas. Los efectos indirectos a través de los cambios en el entorno de cargas también pueden repercutir en la adherencia y producir otros efectos contra las bacterias⁽²⁵⁻²⁹⁾.

Se han realizado varios estudios para evaluar el efecto de AGNPS en bacterias planctónicas Gram-positivas y Gram-negativas. Debido a que la liberación de iones de plata de las nanopartículas está sin duda implicada en la disminución de la viabilidad bacteriana, existen diferentes características (concentración, morfología y presentación de las AGNPS) que son factores importantes a considerar.

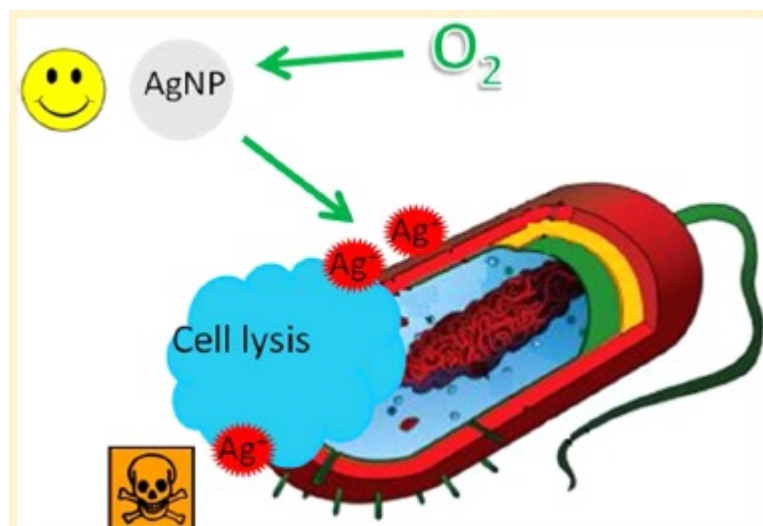


Figura 2: es conocida la actividad antimicrobiana de iones de plata liberados (Ag^+). La Ag^+ es el definitivo tóxico molecular. En algunos trabajos sugieren la falta de toxicidad de AGNPS cuando son sintetizadas y probadas bajo condiciones estrictamente anaerobias que impiden la oxidación de $\text{Ag}^{(0)}$ y la liberación de Ag^+ . Figura tomada de Xiu et al⁽²⁹⁾

Los iones de plata liberados actúan inmediatamente, bloquean la actividad proteica, lo cual es beneficioso para prevenir las infecciones locales. Posiblemente la principal indicación de estos compuestos será la prevención de las infecciones perioperatorias⁽²⁴⁾.

La cantidad de plata debe ser suficiente para proporcionar una acción bactericida sostenida. En algunos estudios se especula con que una baja concentración puede dar lugar al desarrollo de resistencia, por lo que el mantenimiento de una concentración adecuada de plata en el tiempo es crítico. En buffer fosfato salino (PBS), la plata es biológicamente activa en concentraciones tan bajas como 0,05 ppm, pero en fluidos orgánicos, son necesarias concentraciones > 50 ppm para ejercer un efecto antibacteriano^(22, 117-118).

Por otra parte, han surgido muchas preocupaciones acerca de los efectos nocivos sobre la salud humana de AGNPS. Los radicales hidroxilo formados son altamente tóxicos ya que estos dañan proteínas, lípidos y principalmente DNA⁽²⁴⁾. El estrés oxidativo se ha relacionado con la citotoxicidad de AGNPS debido al hecho de que liberen iones de plata. Se ha propuesto que AGNPS tienen potenciales efectos inflamatorios y también pueden causar daños en el material genético en las células ya que las nanopartículas son capaces de atravesar las membranas celulares y alcanzar el núcleo celular. En este sentido, hay un creciente interés en el análisis del potencial de genotoxicidad de las nanopartículas, incluyendo los efectos de los diferentes tamaños y los métodos de síntesis. Sin embargo, poco se sabe acerca de la genotoxicidad de las nanopartículas de plata y sus efectos sobre el ADN de los organismos. Por lo tanto, se requieren más estudios en este campo. Por otra parte, se ha encontrado que las células humanas tienen una mayor resistencia

a los efectos tóxicos de las nanopartículas de plata en comparación con otros organismos como las bacterias^(36, 72, 119).

Tradicionalmente se considera que la plata tiene una toxicidad baja para las células de mamíferos⁽¹²⁰⁻¹²¹⁾. En este sentido, diversos estudios sobre iones de plata generados anódicamente no demostraron ningún efecto citotóxico sobre las células de mamífero en cultivo⁽¹²²⁾, y no se encontraron efectos citotóxicos a una concentración igual o menor a 25g / l⁽¹²³⁾. En diversos estudios en los que se analizaron los efectos de diferentes tipos de nanopartículas de plata se demostró una toxicidad dependiente de la concentración, mientras que las sales solubles correspondientes no tuvieron ningún efecto significativo⁽²²⁾.

El reto, por todo ello, es encontrar el rango de concentración de AgNP que es lo suficientemente alto como para inhibir la adherencia y tener un efecto bactericida para la mayoría de las bacterias, pero que no afecte considerablemente a las células que estarán en contacto o cerca del implante y no desarrolle toxicidad a largo plazo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Partiendo de la hipótesis de que la incorporación de plata en la superficie de aleaciones de titanio empleadas en la fabricación de implantes disminuiría la adherencia bacteriana y la viabilidad de las bacterias adheridas. El objetivo principal sería la evaluación de la adherencia bacteriana en materiales modificados mediante diversas técnicas de incorporación de plata para detectar el que presentara mejores resultados desde el punto de vista de la prevención de la infección.

Más detalladamente, los objetivos específicos serían la evaluación de adherencia bacteriana sobre aleación de titanio con las siguientes modificaciones de superficie:

- (1) Islas de plata
- (2) DLC con plata
- (3) Ti-O dopado con diferentes concentraciones de plata
- (4) Plata implantada iónicamente
- (5) YSZ con plata

MATERIAL Y MÉTODOS

1. BACTERIAS EMPLEADAS

Se realizó un primer estudio con cepas de *S. aureus* 15981, proporcionada amablemente por el Dr. Lasa⁽³⁰⁾ y *S. epidermidis* ATCC 35984 (ambas cepas productoras de biopelícula). Y posteriormente se estudió la adherencia empleando 12 aislamientos clínicos de *Staphylococcus spp.* Estas cepas se aislaron a partir de prótesis ortopédicas de 12 pacientes con infección profunda de prótesis articulares procedentes de dos grandes hospitales universitarios (Hospital Fundación Jiménez Díaz y Hospital de La Princesa) de Madrid. Todos los pacientes fueron diagnosticados de infección de prótesis articular según criterios clínicos habitualmente establecidos⁽¹²⁴⁾.

Las cepas se aislaron utilizando un protocolo de sonicación previamente descrito⁽³¹⁾. Los aislamientos se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales (coagulasa) y galerías de identificación comerciales (API-STAPH; bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) y se mantuvieron congeladas a -20° C en leche descremada hasta que se realizaron los experimentos. Las cepas fueron estudiadas mediante distintos métodos fenotípicos y genotípicos para determinar su capacidad de producir biopelículas bacterianas⁽³²⁾.

2. METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO DE ADHERENCIA

Cada una de las nuevas modificaciones con plata se comparó con los controles de Ti-6Al-4V o Ti-6Al-4V modificado mediante recubrimientos sin plata.

Las cepas de *Staphylococcus spp.* se cultivaron durante la noche en caldo de triptosa de soja a 37°C. Después del cultivo, se recuperaron las bacterias mediante 10 min centrifugación a 4500g a 22°C. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se lavó tres veces con agua estéril salina tamponada con fosfato (PBS). Este sedimento se diluyó en PBS con el fin de obtener una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias (CFU) / ml, lo cual fue confirmado mediante recuento de colonias del cultivo de diluciones en placas. Se colocaron los diferentes materiales modificados y sin modificar en la suspensión bacteriana y se incubaron por triplicado durante 90 min a 37°C para permitir la adhesión. Se utiliza PBS ya que es un tampón sin nutrientes y mantiene el número de estafilococos constante durante los experimentos de adhesión.

Posteriormente, los materiales se lavaron tres veces con PBS estéril para eliminar las bacterias no adheridas. Los materiales se secaron al aire a 22°C. Las placas secas se tiñeron durante 15 minutos con un rápido método de tinción de fluorescencia utilizando el Live / Dead ® Kit de Viabilidad bacteriana (BacklightTM)⁽³³⁾.

De cada material se fotografiaron 8 campos con una cámara Nikon Coolpix 8400 (Nikon, Melville, NY) bajo un microscopio de fluorescencia a una magnificación de 40x. Se tomaron todas las microfotografías de lugares idénticos de acuerdo con un plan preparado de antemano.

Se calculó el área de superficie cubierta con bacterias adheridas utilizando el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizó este enfoque en lugar de tratar de contar bacterias individuales debido a que los estafilococos formaban grupos que consistían en 5-50 células bacterianas individuales, lo cual hace dicho recuento de bacterias poco fiable.

3. METODOLOGÍA DE LOS MATERIALES

Una superficie de Ti-6Al-4V fue modificada de diferentes formas que vamos a pasar a describir.

3.1. Islas de plata

Se empleó el proceso conocido como *reactive sputtering*, para sintetizar y depositar fases metaestables en la superficie de Ti-6Al-4V (125) (126) (127). Se depositaron películas delgadas de óxidos terciarios de Cu-Mn-O y cuaternarios de Ag-Cu-Mn-O (figura 3a). Las películas depositadas eran amorfas y mediante air annealing se obtuvo la cristalización de la plata metálica en el interior de películas de Ag-Cu-Mn-O⁽¹²⁸⁾. De esta manera se sintetizaron islas de plata micrométricas en una superficie de óxido como vemos en la figura 3b. Este tipo de recubrimiento además de las islas de plata aporta la capacidad bactericida de los iones de Cu²⁺.

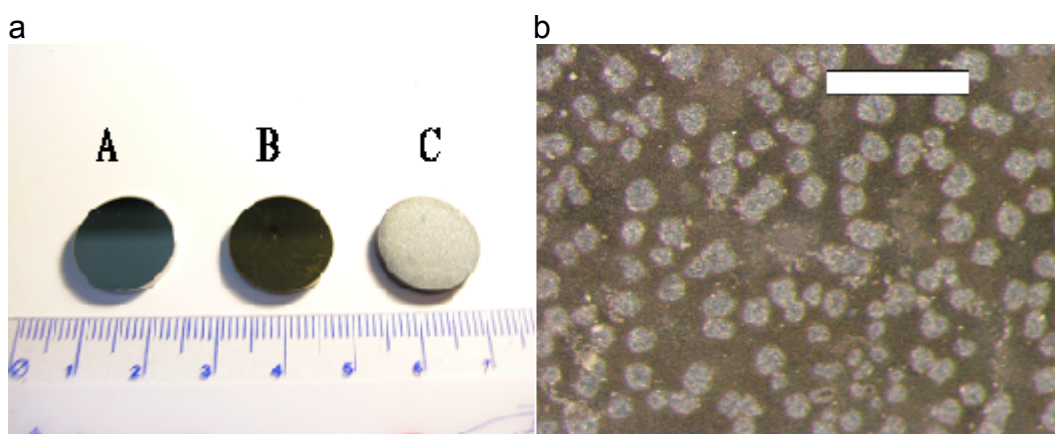


Figura 3. a) Disco de A) Ti-6Al-4V, modificado con B) Cu-Mn-O y C) Ag-Cu-Mn-O. b) Fotografía de la superficie de un disco de Ti-6Al-4V cubierto con islas de plata micrométricas en una superficie Cu-Mn-O. La barra blanca representa 500 μm de longitud⁽²³⁾.

3.2. DLC con plata

Sobre el sustrato (Ti-6Al-4V) inicialmente se deposita una capa de titanio puro de 1 μm . Esta capa previene y elimina las posibles tensiones que pueda

presentar la siguiente capa, además de mejorar su adhesión. Después se procedió a la deposición de la capa de un tipo de DLC como es el Ti-C-N por el método de deposición física en fase vapor (PVD). El proceso de evaporación fue realizado por el método de arco catódico. Se empleó el equipo industrial MIDAS 775 desarrollado por Tekniker.

En la tabla 2 podemos ver la composición de este recubrimiento.

Recubrimiento	Espesor	Ti(%)	N(%)	C(%)
DLC	3,86 μm	15	15	70

Tabla 2. Composición y espesor de la capa de DLC⁽¹²⁹⁾.



Figura 4. Esquema de la composición del material sobre el que se deposita la plata (Ag^0). Imagen cedida por la Unidad de Tribología de IK4 TEKNIKER, Eibar, España.

Sobre esta capa de DLC de 3,86 μm de espesor se depositó la plata en estado puro (Ag^0). La plata fue depositada por *magnetron sputtering*. El espesor de capa es de 200 nm.

En los primeros ensayos con las cepas colección se encontraron problemas con la adherencia de la capa de Ag, así que para mejorar este problema entre el recubrimiento de DLC y el de Ag, se depositó una pequeña capa de cromo (50 micras).

3.3. Ti-O con plata

En la superficie de una muestra de Ti-6Al-4V se depositó Ag y Ti-O por la técnica de arco catódico pulsado, obteniendo 3 tipos diferentes de muestras que se describen en la tabla 3.

Recubrimiento	Espesor	Porcentaje de plata(%)
Ti-O	95,6 nm	
TiO-lowAg	105,8nm	6,4%
TiO-highAg	108,4nm	17,3%

Tabla 3. Recubrimientos comparados en el estudio de Ti-O dopado con diferentes concentraciones de plata determinadas por microscopía electrónica de barrido.

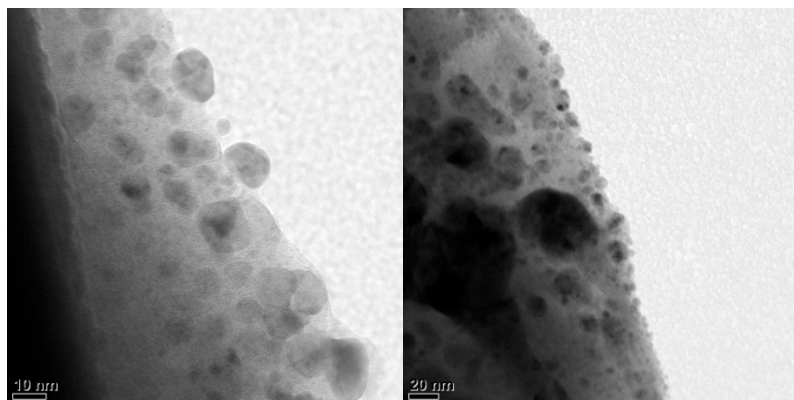


Figura 5. a) Ti-O con un 6,4% de partículas de plata (TiO-lowAg) y b) Ti-O con un 17,3% de partículas de plata (TiO-highAg). Imagen cedida por el Instituto de Ciencias Materiales de Madrid, ICMM.

3.4. Plata implantada iónicamente

En una muestra de Ti-6Al-4V se han implantado iones de plata (Ag^+). El implantador está equipado con una fuente de iones Freeman, un cuadrupolo magnético de masa / carga de selección del haz y una cámara de alto vacío para procesamiento de la muestra.

La energía de implantación se fijó en un valor de 100 keV y se modifican las dosis (tabla 4).

Energía (Kev)	100	100	100
Dosis (ion/cm²)	2×10^{17}	5×10^{16}	1×10^{16}

Tabla 4. Energía de implantación y las diferentes dosis de plata.

Los iones de Ag^+ impactan en las muestras con una corriente de 0,4 mA y una anchura de haz de 7 cm de altura. Todos los tratamientos se realizan sin ninguna fuente de calor adicional, aunque un aumento de temperatura de hasta 80-100 °C podría ser esperado debido al propio bombardeo de iones. El rango de penetración estimada de los átomos de Ag en el sustrato de Ti6Al4V es menor de 20 a 30 nm de profundidad.

3.5. Zirconia cúbica estabilizada con itrio (YSZ) dopada con plata

Las películas nanocompuestas de YSZ se depositaron sobre los materiales de Ti-6Al-4V por reactive magnetron cosputtering. Se oxidaron completamente el itrio y los átomos de circonio en una matriz de zirconia estabilizada con itrio transparente. El contenido de plata resultante es del 41% medido por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X. El tiempo de deposición se fija de tal manera que el espesor de la película es de 1 micra. Después de la deposición, las muestras son recocidas a 300 °C durante dos horas.

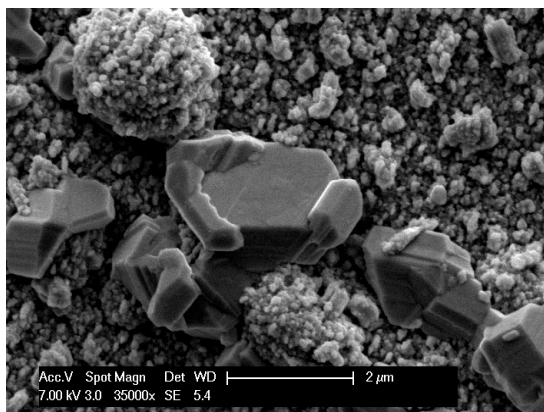


Figura 6 Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie de la película de Ag / YSZ depositada sobre Ti-6Al-4V después del recocido a 300°C. Se observan un conjunto de nanopartículas de plata en el rango de 10-20 nm incrustadas en la matriz de YSZ. Imagen cedida por Institut Jean Lamour-UMR CNRS 719.

4. ESTADÍSTICA

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas no paramétricas, previa evaluación de la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Bartlett.

Para comparar dos muestras entre sí se utilizó la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney y para más de dos muestras la prueba de Kruskal-Wallis.

Los estudios estadísticos se realizaron mediante el software EPI-Info versión 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA).

RESULTADOS

1. RESULTADOS DE ADHERENCIA BACTERIANA

1.1. Resultados de adherencia bacteriana de cepas de colección

Los resultados de adherencia representados en las figuras 7, 9, 11, 13 y 15 indican que ambas cepas mostraron menor adherencia bacteriana para los materiales modificados. En todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$ test de Wilcoxon Mann-Whitney).

La incorporación de plata disminuyó la adherencia bacteriana de forma estadísticamente significativa con respecto al material modificado sin plata excepto en los siguientes casos:

- Cu-Mn-O para ambas cepas.
- DLC para *S. aureus*
- Al comparar Ti-O y TiO-lowAg para *S. epidermidis*
- Entre 5×10^{16} Ag y 2×10^{17} Ag para ambas cepas

Las figuras 7,9,11,13,15 y las tablas 5,7,9,11,13 nos muestran que para todos los materiales *S. epidermidis* mostró mayor adherencia de forma estadísticamente significativa que *S. aureus*, excepto en el caso de la plata implantada. Para este tipo de incorporación de plata no se encontraron diferencias estadísticas en la adherencia de las dos bacterias a cada uno de los materiales.

1.1.1. Islas de plata

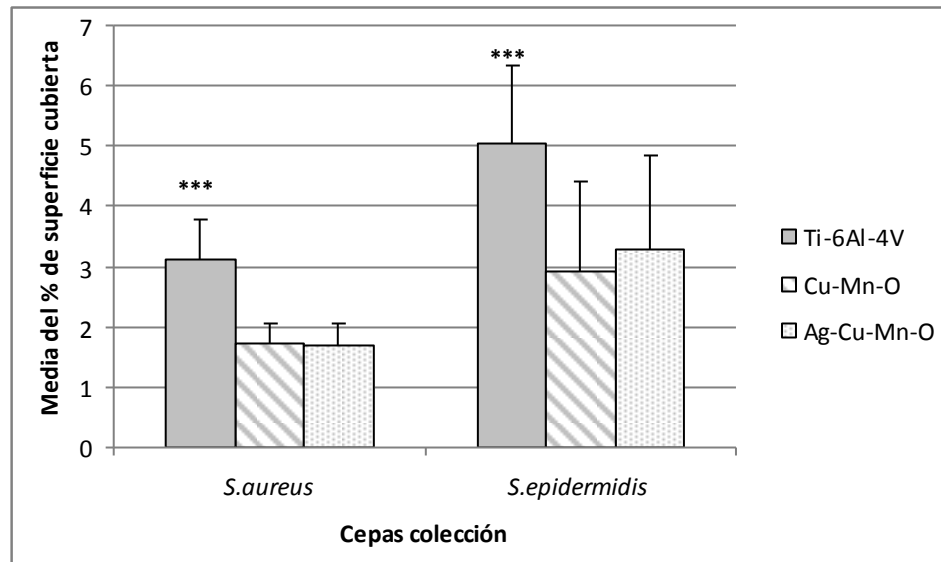


Figura 7. Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta por las cepas colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de materiales fueron estadísticamente significativas.

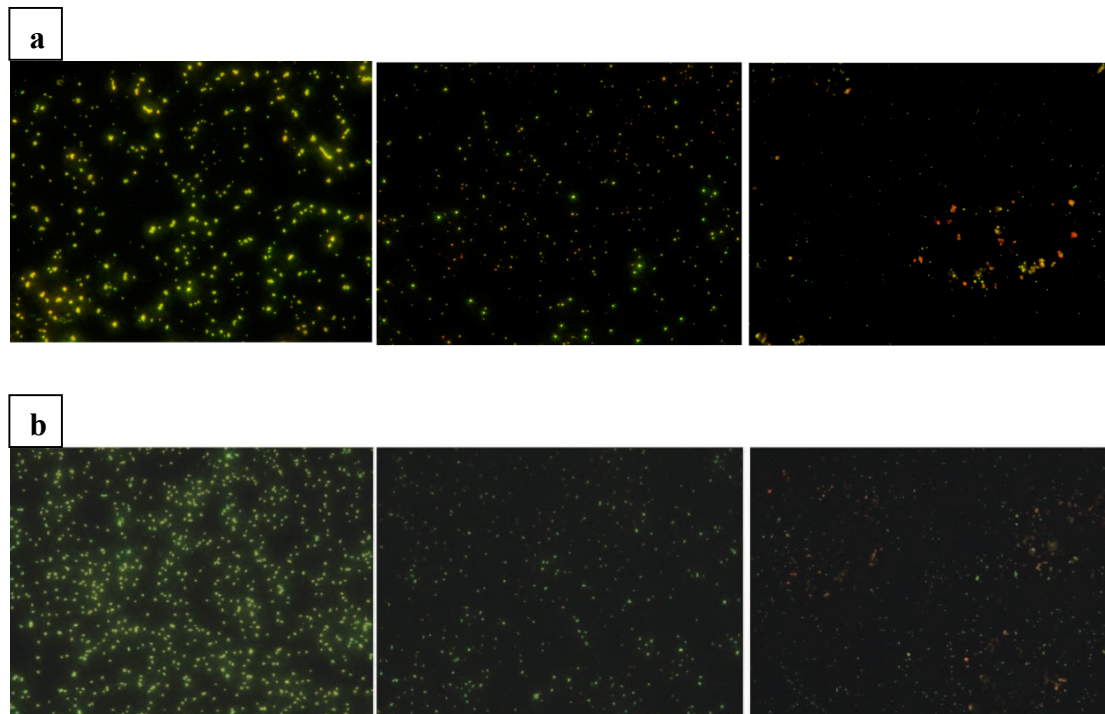


Figura 8. Ejemplo de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia para determinar el porcentaje de la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V con Cu-Mn-O y Ti-6Al-4V con Ag-Cu-Mn-O cubiertos por (a) *S. aureus* y (b) *S. epidermidis*.

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
	valor p	valor p
Ti-6Al-V vs Cu-Mn-O	<0.0001	<0.0001
Ti-6Al-V vs Ag-Cu-Mn-O	<0.0001	0,0005
Cu-Mn-O vs Ag-Cu-Mn-O	0.4297	0,5772

Tabla 4. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	Cu-Mn-O	Ag-Cu-Mn-O
<i>S.aureus</i> vs <i>S.epidermidis</i>	<0.0001	0,0088	0,0014

Tabla 5. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

1.1.2. DLC con plata

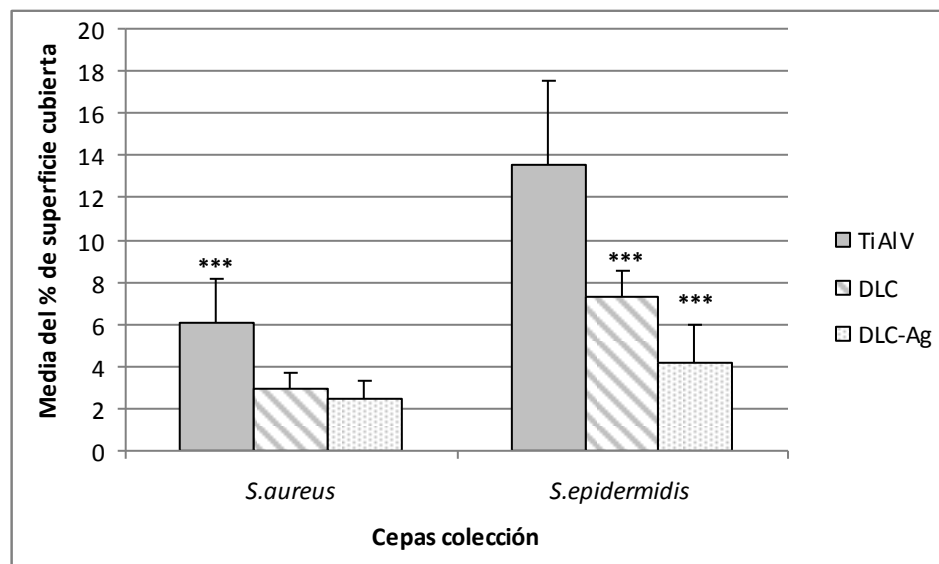
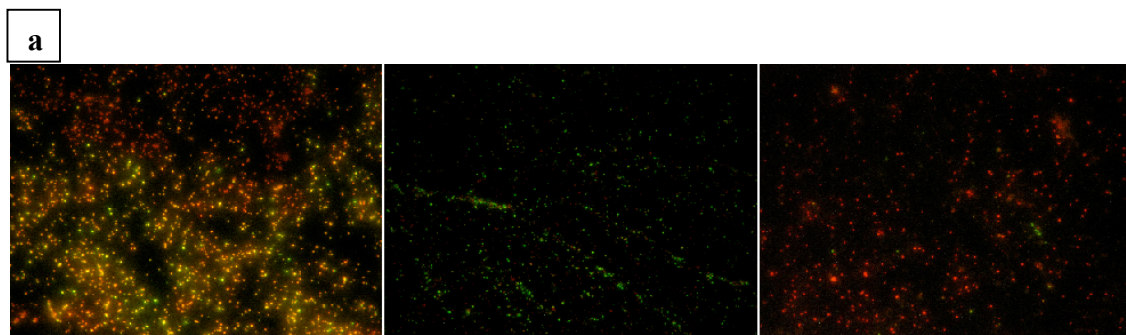


Figura 9. Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta por las cepas colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.



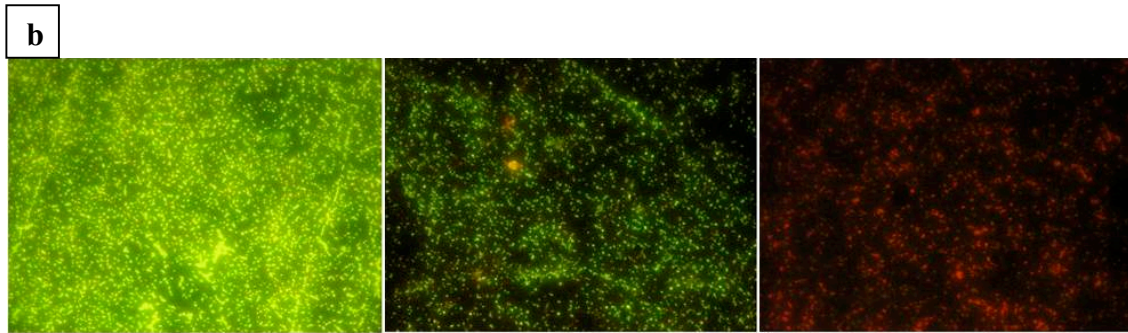


Figura 10. Ejemplo de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia para determinar el porcentaje de la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V con DLC y Ti-6Al-4V con DLC-Ag cubiertos por (a) *S. aureus* y (b) *S. epidermidis*.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	valor p	valor p
Ti-6Al-V vs DLC	<0.0001	<0.0001
Ti-6Al-V vs DLC-Ag	<0.0001	<0.0001
DLC vs DLC-Ag	0,1072	<0.0001

Tabla 6. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	DLC	DLC-Ag
<i>S. aureus</i> vs <i>S. epidermidis</i>	0,0040	0,0145	<0.0001

Tabla 7. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie

1.1.3. Ti-O con plata

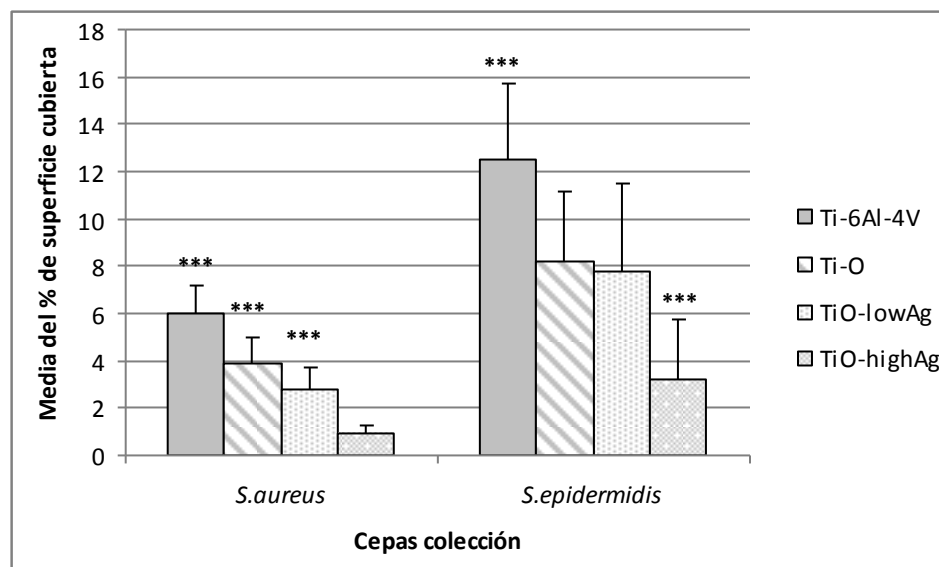


Figura 11. Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta por las cepas colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

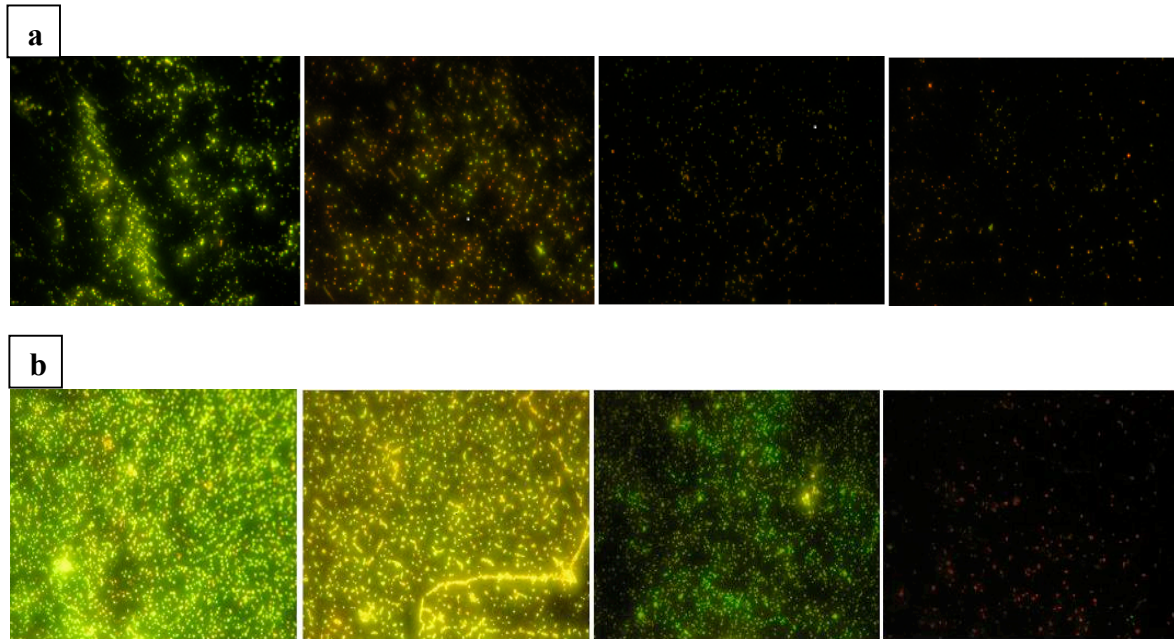


Figura 12 Ejemplo de imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia para determinar el porcentaje de la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V con Ti-O ,Ti-6Al-4V con TiO-lowAg y Ti-6Al-4V con Ti-O-highAg cubiertos por a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*.

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
	valor p	valor p
Ti-6Al-V vs Ti-O	<0.0001	0,0001
Ti-6Al-V vs TiO-low Ag	<0.0001	0,0002
Ti-6Al-V vs TiO-high Ag	<0.0001	<0.0001
Ti-O vs TiO-low Ag	0,0019	0,7259
Ti-O vs TiO-high Ag	<0.0001	<0.0001
TiO-low Ag vs TiO-high Ag	<0.0001	<0.0001

Tabla 8. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	Ti-O	TiO-lowAg	TiO-highAg
<i>S.aureus</i> vs <i>S.epidermidis</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Tabla 9. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

1.1.4. Plata implantada iónicamente

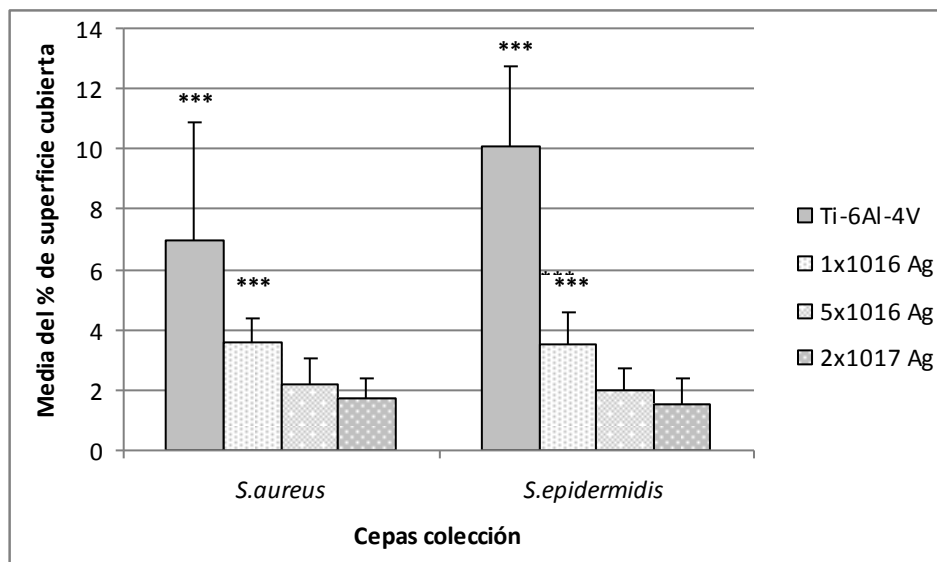


Figura 13. Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta con la cepa colección de *S. aureus* y *S. epidermidis* para cada material. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

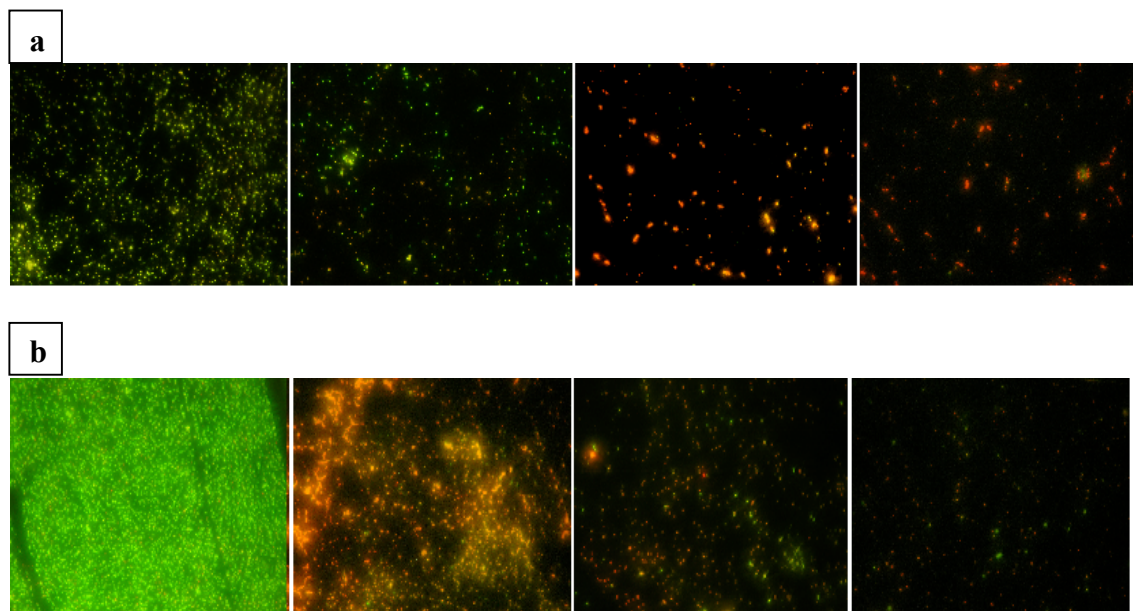


Figura 14 Ejemplo de imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia para determinar el porcentaje de la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V con 1x10¹⁶ Ag, Ti-6Al-4V con 5x10¹⁶ Ag y Ti-6Al-4V con 2x10¹⁷ Ag (ion/cm²) cubierto por a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
	valor p	valor p
Ti-6Al-4V vs 1×10^{16} Ag	0,0004	<0.0001
Ti-6Al-4V vs 5×10^{16} Ag	<0.0001	<0.0001
Ti-6Al-4V vs 2×10^{17} Ag	<0.0001	<0.0001
1×10^{16} Ag vs 5×10^{16} Ag	<0.0001	<0.0001
1×10^{16} Ag vs 2×10^{17} Ag	<0.0001	<0.0001
5×10^{16} Ag vs 2×10^{17} Ag	0,0756	0,0692

Tabla 10. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	1×10^{16} Ag	5×10^{16} Ag	2×10^{17} Ag
<i>S.aureus</i> vs <i>S.epidermidis</i>	0,0017	0,6798	0,3582	0,4025

Tabla 11. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

1.1.5. YSZ con plata

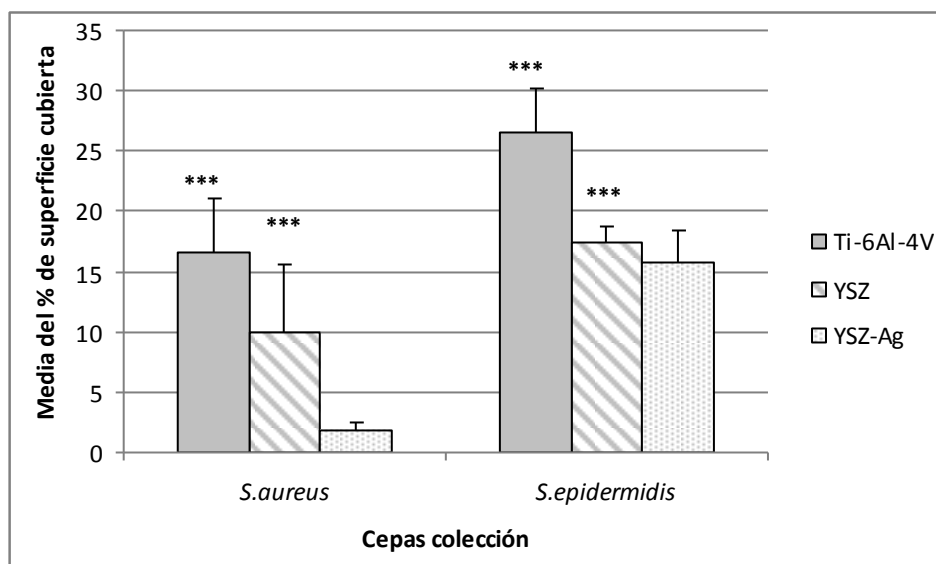


Figura 15. Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta por las cepas colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

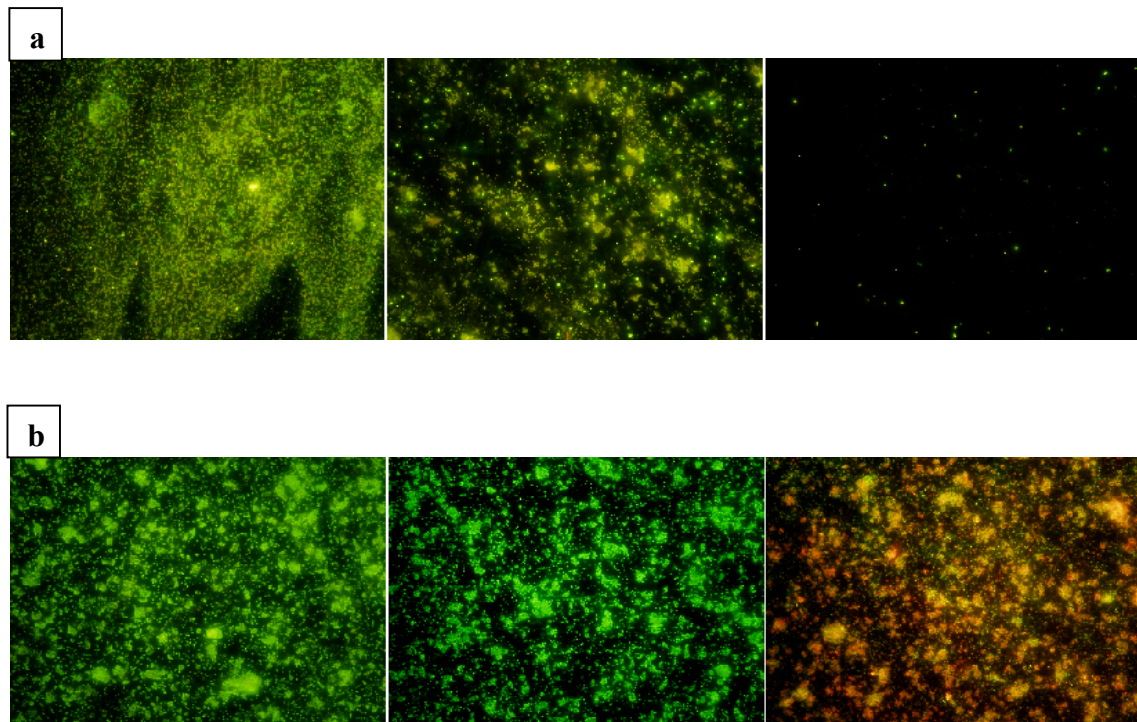


Figura 16 Ejemplo de imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia para determinar el porcentaje de la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V con YSZ y Ti-6Al-4V con YSZ-Ag cubierto por a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
	valor p	valor p
Ti-6Al-4V vs YSZ	0,0002	<0.0001
Ti-6Al-4V vs YSZ-Ag	<0.0001	<0.0001
YSZ vs YSZ-Ag	<0.0001	0,0112

Tabla 12. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	YSZ	YSZ-Ag
<i>S.aureus</i> vs <i>S.epidermidis</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Tabla 13. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

1.2. Resultados de adherencia bacteriana de cepas clínicas

Los resultados de adherencia representados en las figuras 17, 19, 21, 23 y 25 indican que todas las cepas clínicas mostraron menor adherencia bacteriana para los materiales modificados con plata cuando los comparamos con el material sin modificar o modificado sin plata ($p < 0,05$ test de Wilcoxon Mann-Whitney), excepto en las siguientes situaciones:

- La modificación con DLC-Ag no presentó diferencias estadísticas respecto a Ti-6Al-4V para las cepas clínicas de *S. aureus* p1, p2 y respecto a Ti-6Al-4V con DLC para la cepa clínica de *S. aureus* p4.
- Para la cepa clínica p2 tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre los materiales modificados con YSZ y YSZ-Ag
- Para la cepa clínica de *S. epidermidis* p101 la incorporación de una elevada concentración de plata a Ti-O no redujo de forma significativa la adherencia bacteriana.
- En una de las cepas clínicas de *S. aureus*, p4, la implantación iónica de la dosis mínima de plata no fue suficiente para que existieran diferencias con Ti-6Al-4V.

Al comparar las modificaciones de Ti-6Al-4V que incorporan diferentes concentraciones de plata nos encontramos que:

- La incorporación de una elevada concentración de plata a Ti-O no produjo una disminución de la adherencia bacteriana.
- En el caso de la plata implantada iónicamente, únicamente dos cepas clínicas de *S. epidermidis* (p74 y p101), mostraron una disminución de la adherencia estadísticamente significativa cuando incorporamos la dosis más alta de plata.

Con respecto a las modificaciones que no incorporan plata, para la mayoría de las cepas clínicas mostraron una disminución de la adherencia bacteriana estadísticamente significativa con respecto al material sin modificar. Excepto en los siguientes casos:

- Para las cepas clínicas p4, p61, p33 y p101 no se encontraron diferencias estadísticas entre Cu-Mn-O y Ti-6Al-4V
- Dos cepas clínicas de *S. aureus* (p61 y p95) no mostraron diferencias estadísticas entre DLC y Ti-6Al-4V
- La modificación con Ti-O solo redujo la adherencia bacteriana en tres cepas clínicas de *S. epidermidis* (p6, p33 y p53), lo cual asocia el efecto bactericida a la incorporación de plata.
- Para la cepa clínica p33 de *S. epidermidis* no existieron diferencias estadísticas entre el recubrimiento con YSZ y el material sin modificar.

A partir de las tablas 15, 17, 19, 21 y 23 y las figuras 17, 19, 21, 23 y 25 vemos que hay un grupo de cepas clínicas que mostraron una mayor tendencia a adherirse a todos los materiales, aquí podríamos destacar la cepa p4 de *S.*

aureus y la cepa p101 de *S.epidermidis*. Para los materiales modificados, además de estas debemos destacar la cepa p95 de *S. aureus*.

1.2.1. Islas de plata

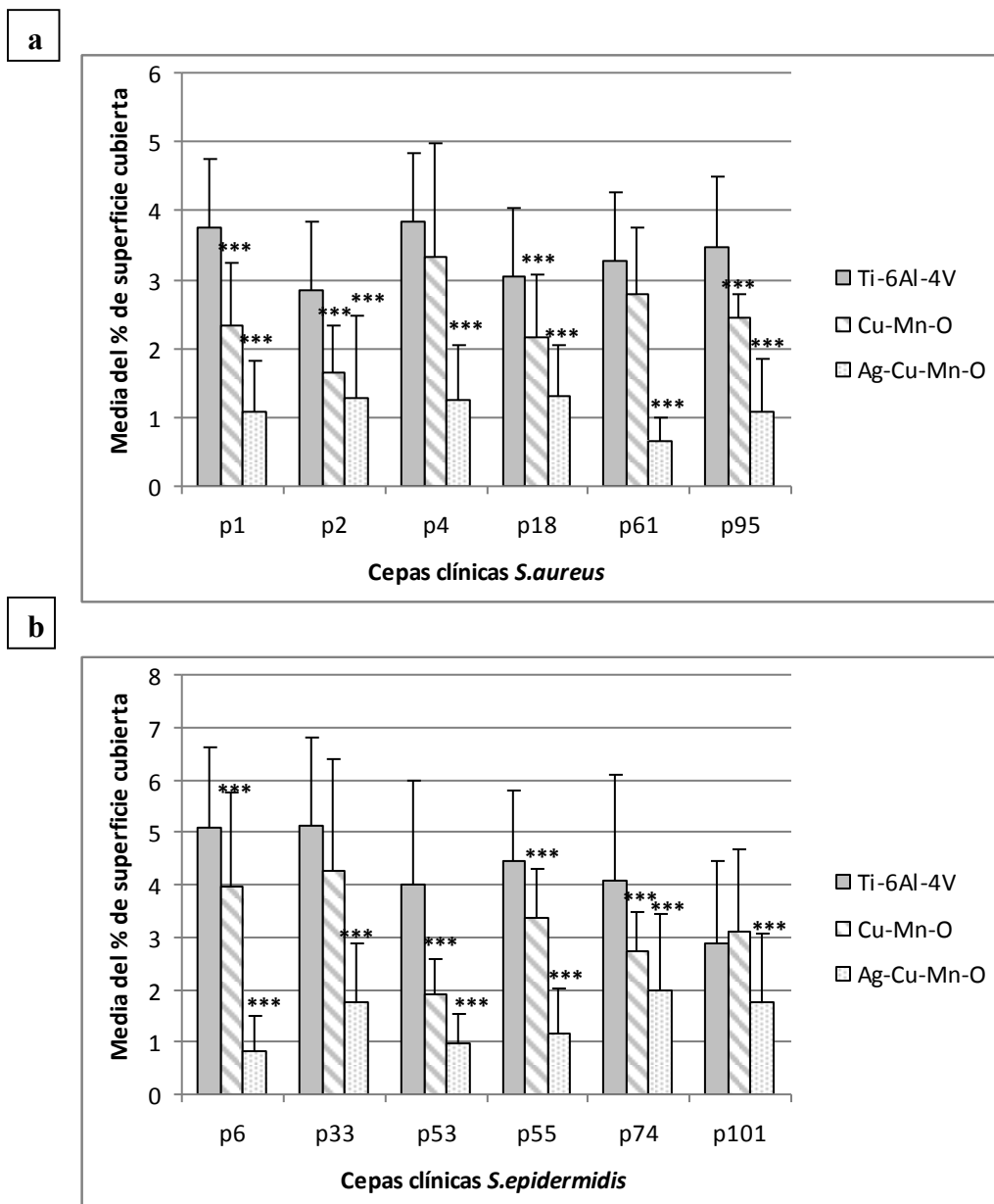


Figura 17. Porcentaje medio de la superficie del biomaterial cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis* para cada material.***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

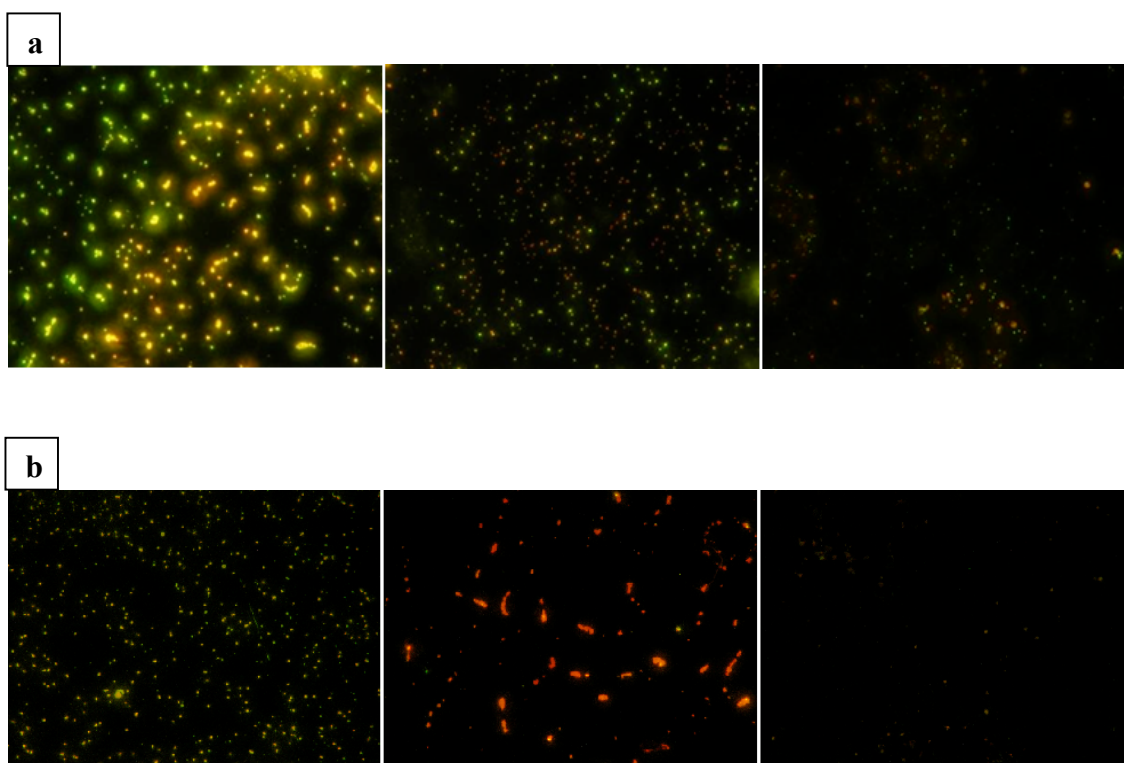


Figura 18. Muestra un ejemplo de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia para la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V con Cu-Mn-O y Ti-6Al-4V con Ag-Cu-Mn-O cubiertos por a) cepa clínica p95 de *S. aureus* y b) cepa clínica p101 de *S. epidermidis*.

	<i>S. aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-V vs Ag-Cu-Mn-O	<0.0001	0,0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Ti-6Al-V vs Cu-Mn-O	0,0001	<0.0001	0,1632	0,0015	0,0827	0,0022
Cu-Mn-O vs Ag-Cu-Mn-O	<0.0001	0,0059	<0.0001	0,0022	<0.0001	<0.0001
	<i>S. epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-V vs Ag-Cu-Mn-O	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,0002	0,0071
Ti-6Al-V vs Cu-Mn-O	0,0362	0,0848	0,0021	0,0064	0,0071	0,6206
Cu-Mn-O vs Ag-Cu-Mn-O	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,0090	0,0048

Tabla 14. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	Cu-Mn-O	Ag-Cu-Mn-O
1-2	0,0075	0,9587	0,0007
1 - 4	0,9670	0,4820	0,0213
1 - 6	0,0036	0,3058	0,0025
1 - 18	0,0285	0,2598	0,2828
1 - 33	0,0035	0,0242	<0,0001
1 - 53	0,4328	0,7407	0,1602
1 - 55	0,0647	0,8200	0,0005
1 - 61	0,1729	0,0072	0,0674
1 - 74	0,9918	0,0195	0,0498
1 - 95	0,4327	0,8685	0,1502
1 - 101	0,0214	0,0756	0,0711
2 - 4	0,0509	0,7326	<0,0001
2 - 6	<0,0001	0,0590	<0,0001
2 - 18	0,5422	0,3847	0,0142
2 - 33	<0,0001	0,0674	<0,0001
2 - 53	0,0886	0,7716	0,0789
2 - 55	<0,0001	0,6116	<0,0001
2 - 61	0,0706	0,5615	<0,0001
2 - 74	0,0145	0,0783	<0,0001
2 - 95	0,1344	0,7953	<0,0001
2 - 101	0,7805	0,1037	0,0004
4 - 6	0,0145	0,0368	0,3319
4 - 18	0,1898	0,7486	0,0018
4 - 33	0,0090	0,0885	0,0411
4 - 53	1,0000	0,3064	0,0008
4 - 55	0,0523	0,6495	0,3318
4 - 61	0,7333	<0,0001	0,5023
4 - 74	0,5844	0,1029	0,5558
4 - 95	0,5841	0,4141	0,2262
4 - 101	0,0390	0,1697	0,7330
6 - 18	<0,0001	0,0057	0,0005
6 - 33	0,8607	0,0026	0,8285
6 - 53	0,0618	0,1993	0,0001
6 - 55	0,1191	0,1530	0,2043
6 - 61	0,0001	0,8117	0,0259
6 - 74	0,0353	0,0017	0,0251
6 - 95	0,0009	0,1547	0,0075
6 - 101	0,0001	0,0011	0,1035
18 - 33	<0,0001	0,1398	<0,0001
18 - 53	0,1008	0,1186	0,7255
18 - 55	0,0018	0,4082	0,0001
18 - 61	0,4511	0,0012	0,0129
18 - 74	0,1031	0,2152	0,0066
18 - 95	0,2080	0,1206	0,0224
18 - 101	0,3530	0,3213	0,0318
33 - 53	0,0776	0,0075	<0,0001
33 - 55	0,1899	0,0603	0,2351
33 - 61	0,0002	<0,0001	0,0105
33 - 74	0,0391	0,8607	0,0025
33 - 95	0,0006	0,0237	<0,0001
33 - 101	0,0001	0,8044	0,0337

	Ti-6Al-4V	Cu-Mn-O	Ag-Cu-Mn-O
53 - 55	0,6128	0,7024	<0,0001
53 - 61	0,1399	0,0877	0,0023
53 - 74	0,7805	0,0136	0,0011
53 - 95	0,4389	0,9339	0,0053
53 - 101	0,0453	0,0316	0,0032
55 - 61	0,0018	0,2037	0,0617
55 - 74	0,2692	0,0486	0,0399
55 - 95	0,0133	0,9340	0,0008
55 - 101	0,0008	0,0510	0,3726
61 - 74	0,1600	0,0004	0,7804
61 - 95	0,8444	0,2134	0,2731
61 - 101	0,1095	0,0040	0,7082
74 - 95	0,4209	0,0315	0,2347
74 - 101	0,0203	0,7647	0,6838
95 - 101	0,0760	0,0395	0,1259

Tabla 15. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

1.2.2. DLC con plata

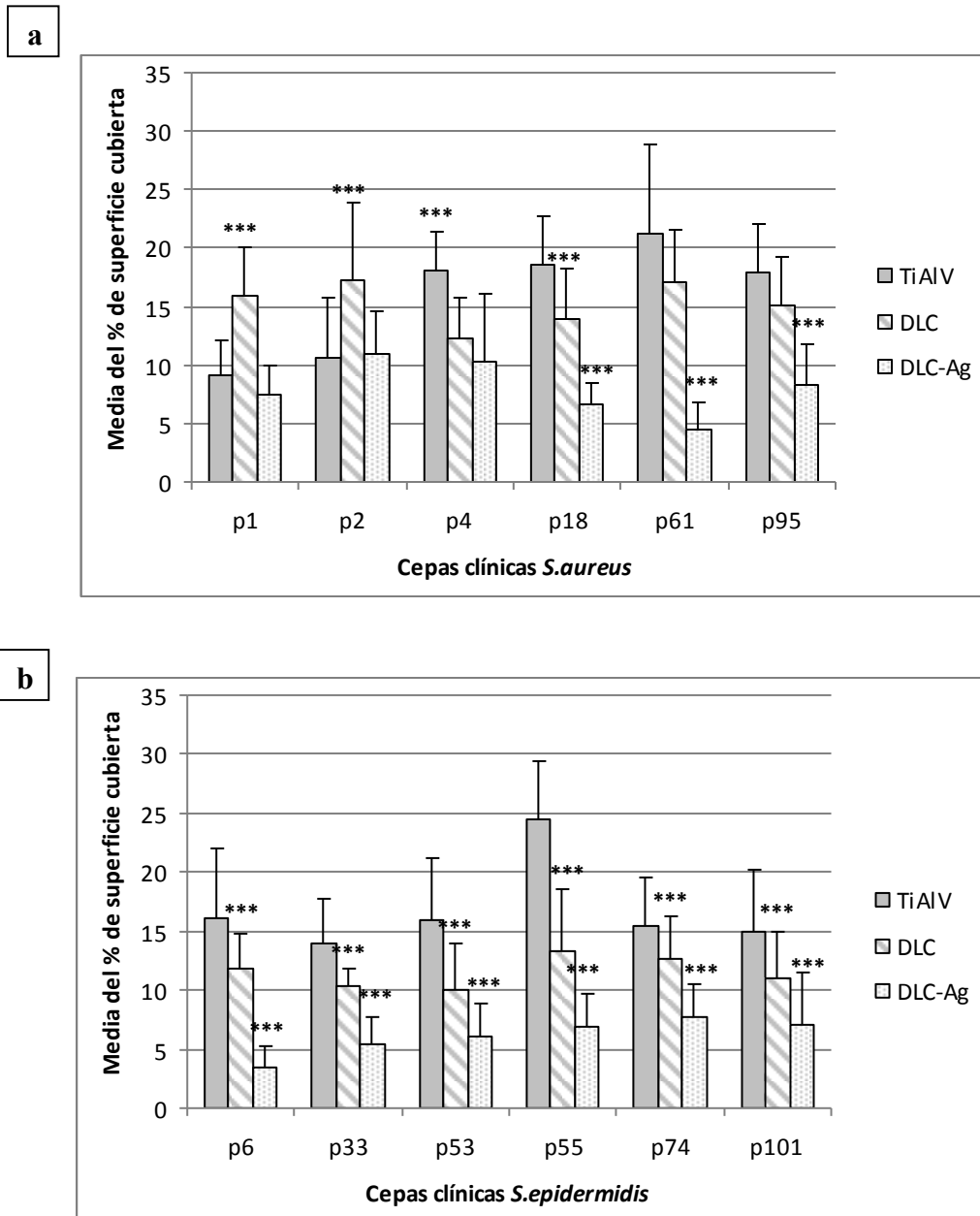


Figura 19. Porcentaje medio de la superficie del biomaterial cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis* para cada material. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

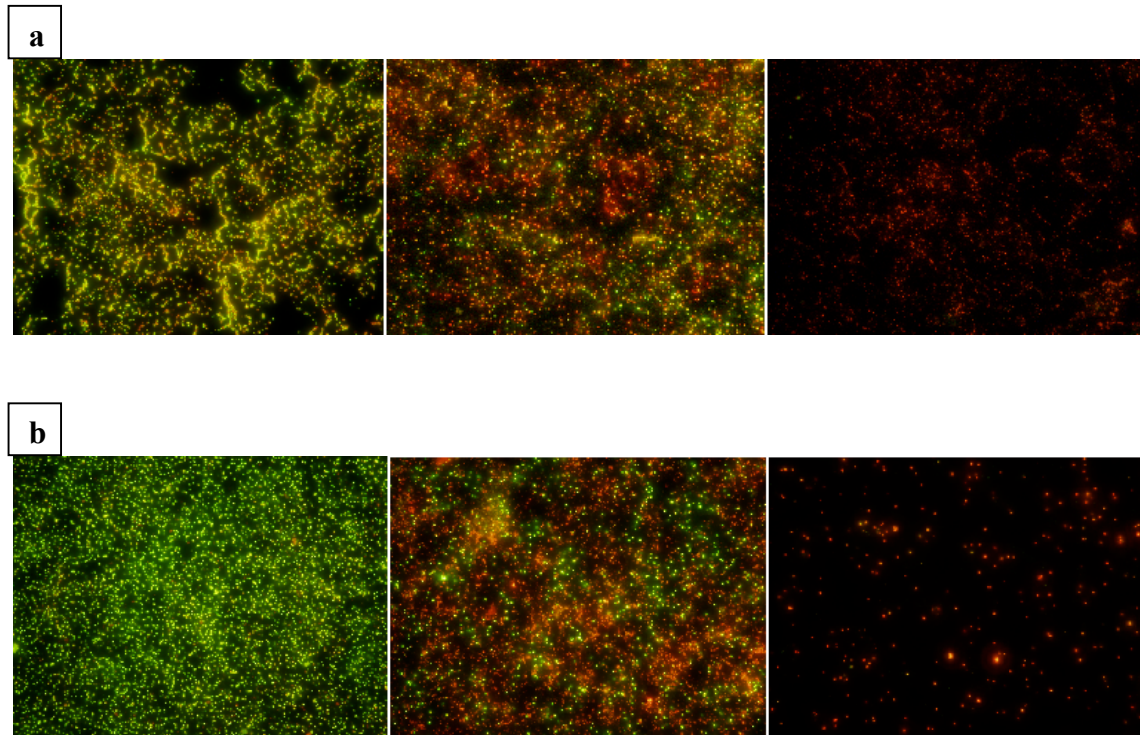


Figura 20. Ejemplo de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia para la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V con DLC y Ti-6Al-4V con DLC-Ag cubiertos por a) cepa clínica p18 de *S. aureus* y (b) cepa clínica p33 de *S. epidermidis*.

	<i>S. aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-V vs DLC	<0.0001	0.0001	<0.0001	0.0007	0.1033	0.1032
Ti-6Al-V vs DLC-Ag	0,0564	0.1349	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
DLC vs DLC-Ag	<0.0001	0.0006	0.4272	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	<i>S. epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-V vs DLC	0.0096	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0239	0.0167
Ti-6Al-V vs DLC-Ag	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
DLC vs DLC-Ag	<0.0001	<0.0001	0.0011	0.0001	<0.0001	0.0069

Tabla 16. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	DLC	DLC-Ag
1-2	0,6352	0,5226	0,0006
1 - 4	<0,0001	0,0032	0,0215
1 - 6	<0,0001	0,0009	<0,0001
1 - 18	<0,0001	0,1194	0,3863
1 - 33	<0,0001	<0,0001	0,0209
1 - 53	<0,0001	<0,0001	0,2046
1 - 55	<0,0001	0,0578	0,6575
1 - 61	<0,0001	0,2567	0,0004
1 - 74	<0,0001	0,0102	0,6279
1 - 95	<0,0001	0,9097	0,4393
1 - 101	0,0001	0,0003	0,9015
2 - 4	<0,0001	0,0047	0,9671
2 - 6	0,0001	0,0020	<0,0001
2 - 18	<0,0001	0,0928	0,0001
2 - 33	0,0003	0,0001	<0,0001
2 - 53	0,0001	<0,0001	<0,0001
2 - 55	<0,0001	0,0412	0,0002
2 - 61	<0,0001	0,7029	<0,0001
2 - 74	0,0001	0,0203	0,0012
2 - 95	<0,0001	0,4036	0,0096
2 - 101	0,0023	0,0006	0,0024
4 - 6	0,0761	0,8527	0,0001
4 - 18	0,8125	0,1834	0,0073
4 - 33	0,0003	0,0158	0,0016
4 - 53	0,0239	0,0145	0,0061
4 - 55	<0,0001	0,8125	0,0182
4 - 61	0,1768	0,0003	0,0005
4 - 74	0,0354	0,8205	0,0391
4 - 95	0,6575	0,0073	0,0832
4 - 101	0,0172	0,2654	0,0266
6 - 18	0,0513	0,1244	<0,0001
6 - 33	0,2928	0,0525	0,0020
6 - 53	0,9179	0,0198	0,0012
6 - 55	<0,0001	0,5989	<0,0001
6 - 61	0,0209	<0,0001	0,1937
6 - 74	0,9835	0,4516	<0,0001
6 - 95	0,1403	0,0012	<0,0001
6 - 101	0,5498	0,4768	0,0040
18 - 33	0,0001	0,0009	0,0968
18 - 53	0,0221	0,0010	0,7104
18 - 55	0,0001	0,5027	0,8205
18 - 61	0,3376	0,0112	0,0016
18 - 74	0,0246	0,2744	0,1670
18 - 95	0,5777	0,1869	0,1295
18 - 101	0,0086	0,0288	0,5429
33 - 53	0,1146	0,1217	0,4271
33 - 55	0,0000	0,3272	0,0634
33 - 61	0,0010	0,0000	0,1076
33 - 74	0,1348	0,0220	0,0057
33 - 95	0,0013	0,0000	0,0091
33 - 101	0,5361	0,6499	0,1608

	Ti-6Al-4V	DLC	DLC-Ag
53 - 55	<0,0001	0,0227	0,3808
53 - 61	0,0288	<0,0001	0,0391
53 - 74	1,0000	0,0030	0,0889
53 - 95	0,1011	0,0001	0,0477
53 - 101	0,5847	0,1702	0,3376
55 - 61	0,1171	0,0150	0,0017
55 - 74	<0,0001	0,9589	0,4035
55 - 95	0,0001	0,2480	0,1735
55 - 101	<0,0001	0,2610	0,7649
61 - 74	0,0145	0,0006	0,0002
61 - 95	0,1869	0,1296	0,0004
61 - 101	0,0063	<0,0001	0,0281
74 - 95	0,0761	0,0273	0,6500
74 - 101	0,5159	0,1548	0,7492
95 - 101	0,0489	0,0015	0,3751

Tabla 17. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

1.2.3. Ti-O con plata

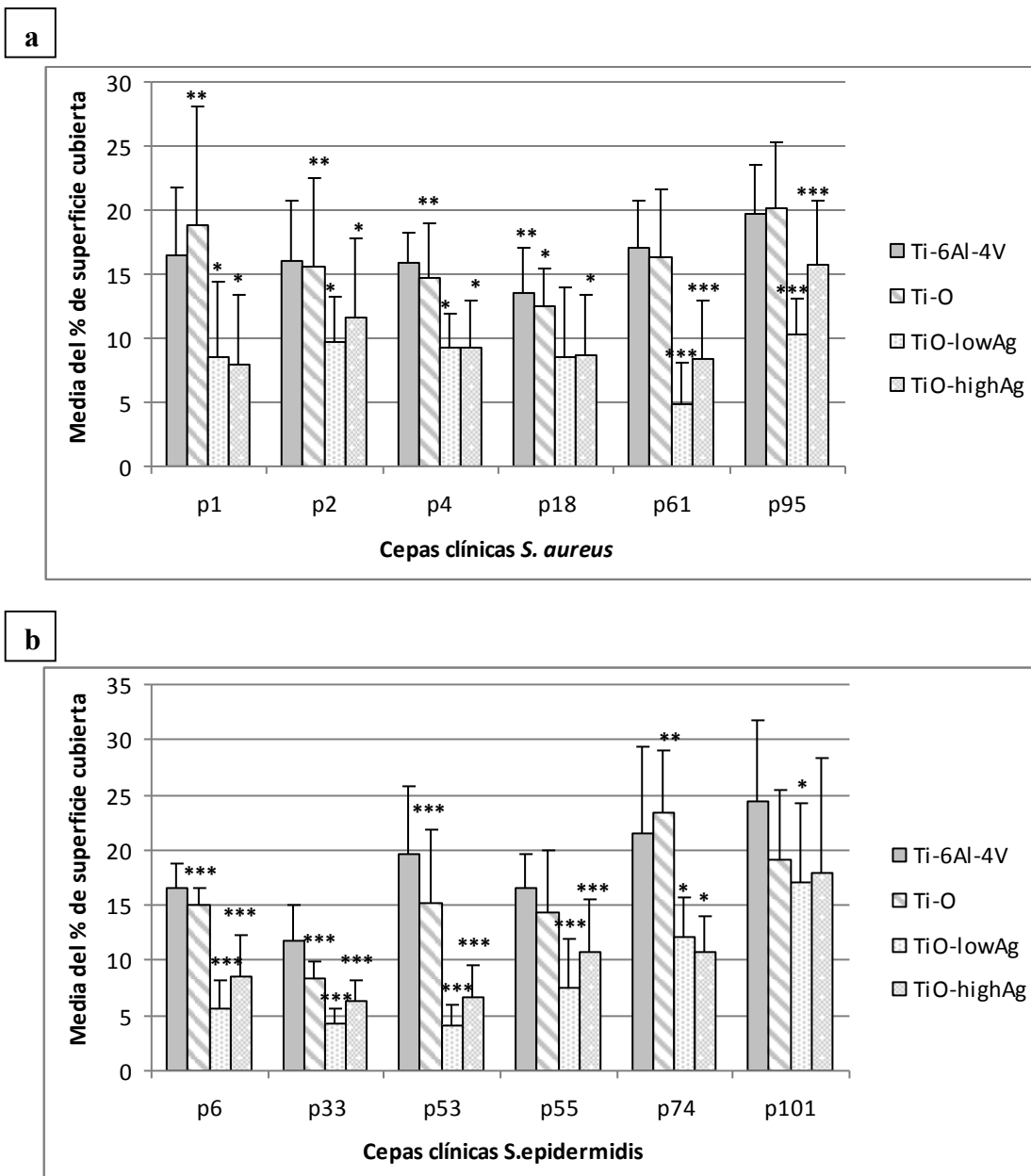


Figura 21. Porcentaje medio de la superficie de cada material cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. * Las diferencias fueron estadísticamente significativas solo con el material sin modificar **Las diferencias entre los materiales modificados fueron estadísticamente significativas ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

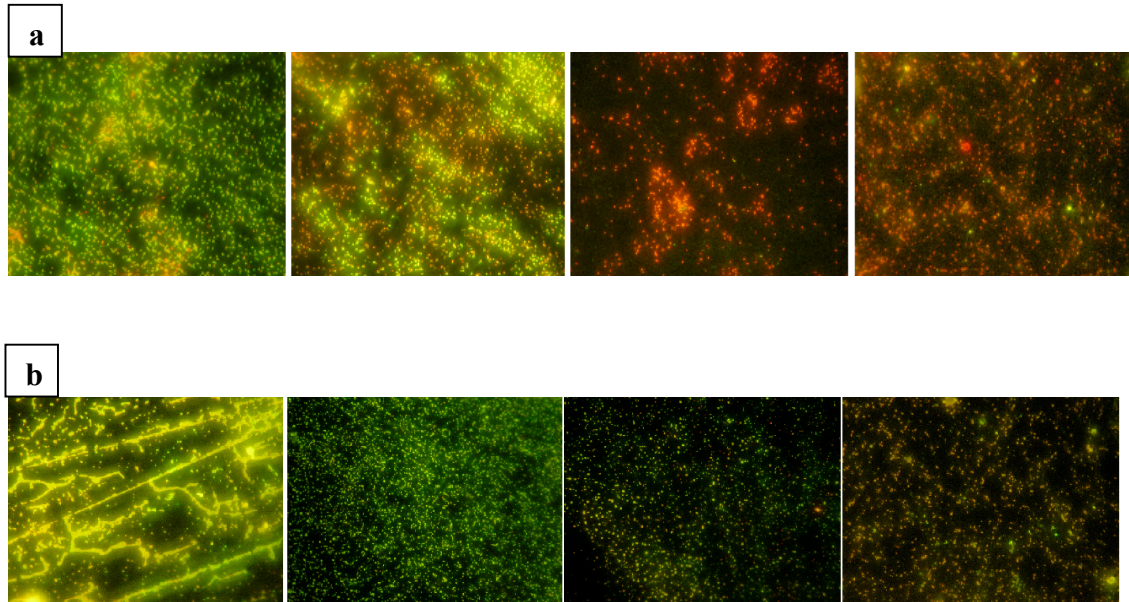


Figura 22. Ejemplo de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia para la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V con Ti-O, Ti-6Al-4V modificado con TiO-lowAg y Ti-6Al-4V modificado con TiO-highAg cubiertas por la cepa clínica a) p2 de *S. aureus* y b) p6 de *S. epidermidis*

	<i>S. aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-V vs Ti-O	0,7104	0,6650	0,5026	0,3752	0,5918	0,6952
Ti-6Al-V vs TiO-low Ag	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0010	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-V vs TiO-high Ag	<0,0001	0,0013	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,0059
Ti-O vs TiO-low Ag	0,0001	0,0031	<0,0001	0,0032	<0,0001	<0,0001
Ti-O vs TiO-high Ag	<0,0001	0,0328	0,0001	0,0010	<0,0001	0,0067
Ti-O-low Ag vs TiO-high Ag	0,7966	0,3533	0,8447	0,8045	0,0015	0,0001
	<i>S. epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-V vs Ti-O	0,0335	<0,0001	0,0354	0,2276	0,2699	0,0635
Ti-6Al-V vs TiO-low Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0010
Ti-6Al-V vs TiO-high Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0909
Ti-O vs TiO-low Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,3025
Ti-O vs TiO-high Ag	<0,0001	0,0004	<0,0001	0,0215	<0,0001	0,9425
TiO-low Ag vs TiO-high Ag	0,0065	0,0003	0,0011	0,0145	0,1547	0,5498

Tabla 18. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	Ti-O	TiO-highAg	TiO-lowAg
1-2	0,9589	0,2744	0,3481	0,0304
1 - 4	0,3374	0,2835	0,3643	0,1703
1 - 6	0,2009	0,2975	0,2197	0,4094
1 - 18	0,0500	0,0154	0,9918	0,5227
1 - 33	0,0017	<0,0001	0,0538	0,5847
1 - 53	0,0288	0,2398	0,0422	1,0000
1 - 55	0,5158	0,1903	0,9753	0,0712
1 - 61	0,4271	0,6501	0,0303	0,4897
1 - 74	0,0112	0,0239	0,0193	0,0119
1 - 95	0,0108	0,2084	0,1194	<0,0001
1 - 101	0,0002	0,5567	0,0002	0,0009
2 - 4	0,5429	0,8771	0,7105	0,2084
2 - 6	1,0000	0,9342	0,0001	0,0727
2 - 18	0,0551	0,1518	0,2046	0,0373
2 - 33	0,0016	0,0002	<0,0001	<0,0001
2 - 53	0,1608	0,9671	<0,0001	0,0009
2 - 55	0,7965	0,7028	0,0259	0,8934
2 - 61	0,5636	0,6062	0,0001	0,0363
2 - 74	0,0296	0,0003	0,0130	0,8125
2 - 95	0,0118	0,0133	0,2083	0,0020
2 - 101	0,0001	0,0477	0,0002	0,0832
4 - 6	0,3863	0,8770	0,0001	0,4641
4 - 18	0,0158	0,0320	0,2160	0,3979
4 - 33	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0052
4 - 53	0,0433	0,9097	<0,0001	0,0172
4 - 55	0,4454	0,9179	0,0354	0,2084
4 - 61	0,2566	0,3222	0,0001	0,2789
4 - 74	0,0203	<0,0001	0,0044	0,1123
4 - 95	0,0004	0,0010	0,2121	<0,0001
4 - 101	<0,0001	0,0102	0,0001	0,0126
6 - 18	0,0069	0,0006	0,0796	0,9261
6 - 33	<0,0001	<0,0001	0,1096	0,0513
6 - 53	0,2236	0,8366	0,0391	0,1053
6 - 55	0,8446	0,9835	0,2046	0,0696
6 - 61	0,5989	0,2523	0,1430	0,7336
6 - 74	0,0466	<0,0001	<0,0001	0,0233
6 - 95	0,0023	0,0001	<0,0001	<0,0001
6 - 101	<0,0001	0,0167	<0,0001	0,0049
18 - 33	0,1100	<0,0001	0,0022	0,1701
18 - 53	0,0006	0,1488	0,0022	0,2121
18 - 55	0,0052	0,1460	0,5847	0,1195
18 - 61	0,0039	0,0109	0,0209	0,8366
18 - 74	0,0001	<0,0001	0,0097	0,0239
18 - 95	<0,0001	<0,0001	0,0577	<0,0001
18 - 101	<0,0001	0,0001	0,0001	0,0071
33 - 53	<0,0001	<0,0001	0,4330	0,7104
33 - 55	0,0001	0,0001	0,0105	0,0006
33 - 61	<0,0001	<0,0001	0,6723	0,1547
33 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
33 - 95	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
33 - 101	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0011

	Ti-6Al-4V	Ti-O	TiO-highAg	TiO-lowAg
53 - 55	0,1518	0,8045	0,0031	0,0018
53 - 61	0,2836	0,4831	0,6278	0,2609
53 - 74	0,5226	0,0001	<0,0001	0,0001
53 - 95	0,5093	0,0073	<0,0001	<0,0001
53 - 101	0,0083	0,0345	<0,0001	0,0006
55 - 61	0,7336	0,4036	0,0133	0,0422
55 - 74	0,0328	<0,0001	0,0007	0,7965
55 - 95	0,0063	0,0024	0,0096	0,0021
55 - 101	<0,0001	0,0069	<0,0001	0,0233
61 - 74	0,0665	0,0002	<0,0001	0,0137
61 - 95	0,0187	0,0203	<0,0001	<0,0001
61 - 101	0,0002	0,0728	<0,0001	0,0036
74 - 95	0,6952	0,0513	0,0501	0,0004
74 - 101	0,1923	0,0198	0,0047	0,0526
95 - 101	0,0433	0,5990	0,0003	0,3123

Tabla 19. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

1.2.4. Plata implantada iónicamente

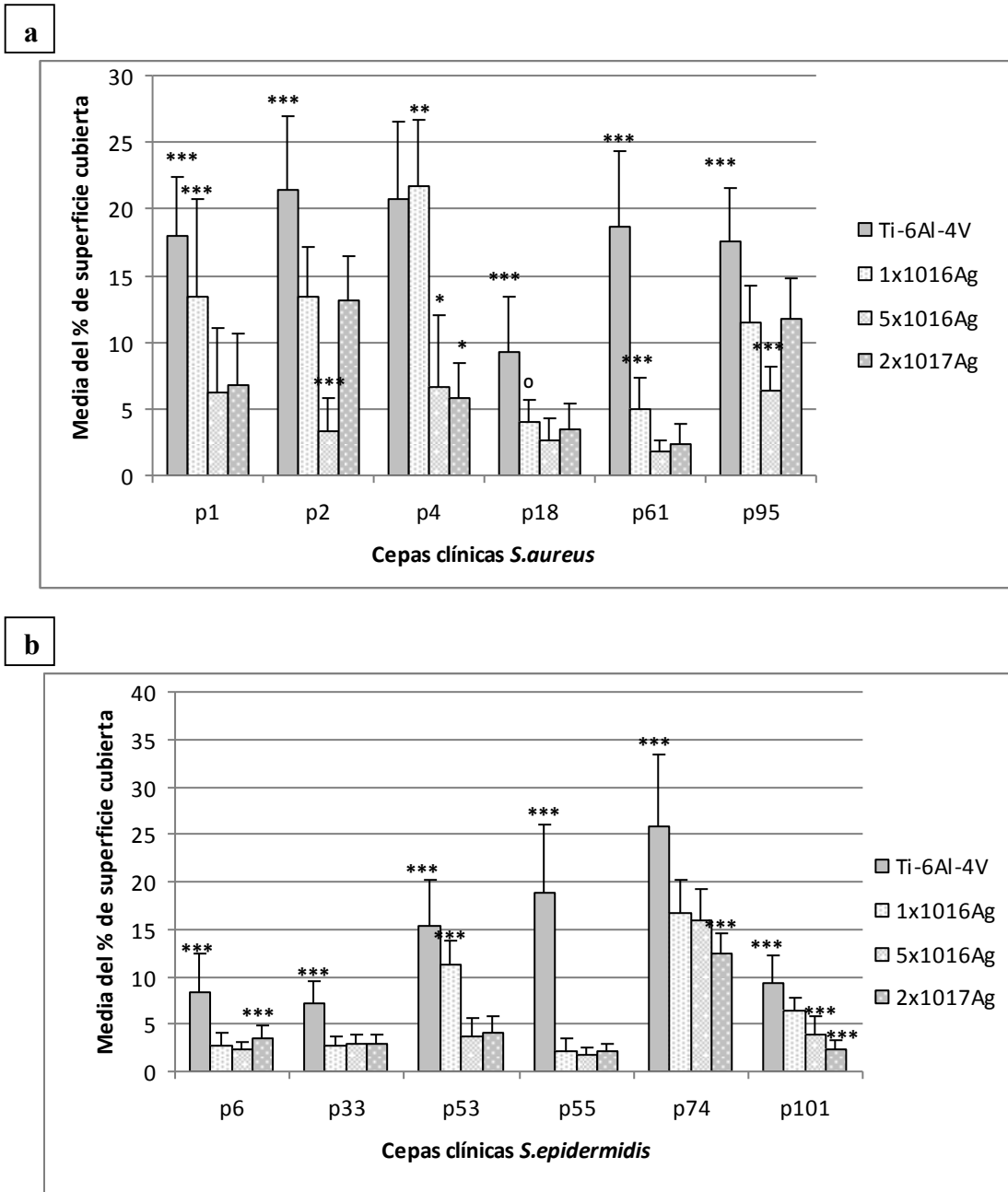


Figura 23. Porcentaje medio de la superficie de cada material cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. * Las diferencias fueron estadísticamente significativas solo con el material sin modificar **Las diferencias entre los materiales modificados fueron estadísticamente significativas ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas ° Las diferencias fueron estadísticamente significativas con el resto excepto 2x10¹⁷ Ag

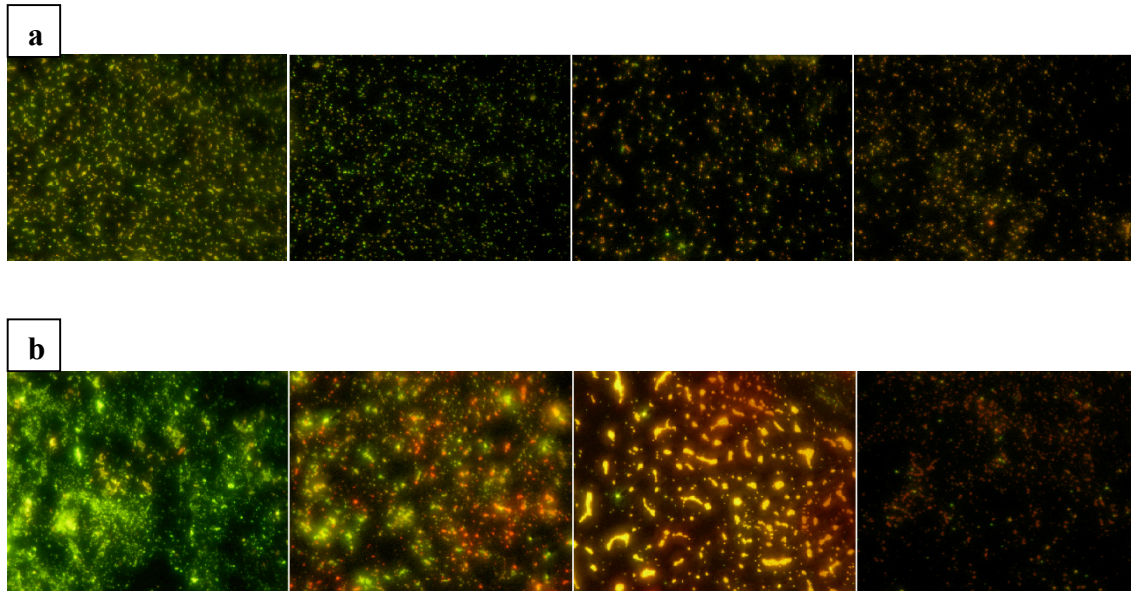


Figura 24. Ejemplo de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia para la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V modificado con 1×10^{16} Ag, Ti-6Al-4V modificado con 5×10^{16} Ag y Ti-6Al-4V modificado con 2×10^{17} Ag cubiertos por a) cepa clínica p1 de *S. aureus* y (b) cepa clínica p74 de *S. epidermidis*.

	<i>S. aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-4V vs 1×10^{16} Ag	0,0163	<0,0001	0,4579	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-4V vs 5×10^{16} Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-4V vs 2×10^{17} Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1×10^{16} Ag vs 5×10^{16} Ag	0,0004	<0,0001	<0,0001	0,0118	<0,0001	<0,0001
1×10^{16} Ag vs 2×10^{17} Ag	0,0005	0,6649	<0,0001	0,1973	<0,0001	0,6647
5×10^{16} Ag vs 2×10^{17} Ag	0,2928	<0,0001	0,3751	0,1668	0,2193	<0,0001
	<i>S. epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-4V vs 1×10^{16} Ag	<0,0001	<0,0001	0,0023	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-4V vs 5×10^{16} Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-4V vs 2×10^{17} Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1×10^{16} Ag vs 5×10^{16} Ag	0,3424	0,6950	<0,0001	0,4632	0,4893	<0,0001
1×10^{16} Ag vs 2×10^{17} Ag	0,0279	0,5425	<0,0001	0,8932	<0,0001	<0,0001
5×10^{16} Ag vs 2×10^{17} Ag	0,0003	0,7648	0,5225	0,2785	0,0003	0,0013

Tabla 20. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	1x1016Ag	5x1016Ag	2x1017Ag
1-2	0,0354	0,7182	0,0549	<0,0001
1 - 4	0,1170	0,0003	0,4212	0,4452
1 - 6	<0,0001	<0,0001	0,0017	0,0010
1 - 18	<0,0001	<0,0001	0,0066	0,0004
1 - 33	<0,0001	<0,0001	0,0363	<0,0001
1 - 53	0,0382	0,8852	0,2315	0,0085
1 - 55	0,3375	<0,0001	0,0001	<0,0001
1 - 61	0,9589	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1 - 74	0,0003	0,0711	<0,0001	<0,0001
1 - 95	0,8689	0,8527	0,2356	0,0001
1 - 101	<0,0001	0,0002	0,3425	<0,0001
2 - 4	0,7105	<0,0001	0,0003	<0,0001
2 - 6	<0,0001	<0,0001	0,1167	<0,0001
2 - 18	<0,0001	<0,0001	0,4389	<0,0001
2 - 33	<0,0001	<0,0001	0,8205	<0,0001
2 - 53	0,0003	0,0076	0,3322	<0,0001
2 - 55	0,3534	<0,0001	0,0111	<0,0001
2 - 61	0,1077	<0,0001	0,0096	<0,0001
2 - 74	0,0363	0,0065	<0,0001	0,2789
2 - 95	0,0078	0,0133	<0,0001	0,1322
2 - 101	<0,0001	<0,0001	0,1830	<0,0001
4 - 6	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0021
4 - 18	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0011
4 - 33	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4 - 53	0,0025	<0,0001	0,0013	0,0198
4 - 55	0,4832	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4 - 61	0,3122	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4 - 74	0,0253	0,0004	<0,0001	<0,0001
4 - 95	0,0489	<0,0001	0,4034	<0,0001
4 - 101	<0,0001	<0,0001	0,0024	<0,0001
6 - 18	0,2397	0,0265	0,7725	0,4451
6 - 33	0,8285	0,6349	0,0452	0,0272
6 - 53	<0,0001	<0,0001	0,0037	0,5565
6 - 55	<0,0001	0,0883	0,0369	0,0001
6 - 61	<0,0001	0,0003	0,0361	0,0025
6 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
6 - 95	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
6 - 101	0,0513	<0,0001	0,0002	0,0005
18 - 33	0,0303	0,0226	0,4828	0,9753
18 - 53	<0,0001	<0,0001	0,0488	0,1607
18 - 55	<0,0001	0,0002	0,1139	0,0327
18 - 61	<0,0001	0,2880	0,0885	0,0868
18 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
18 - 95	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
18 - 101	0,7414	<0,0001	0,0145	0,1637
33 - 53	<0,0001	<0,0001	0,1487	0,0252
33 - 55	<0,0001	0,0071	0,0002	0,0032
33 - 61	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0831
33 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
33 - 95	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
33 - 101	0,0036	<0,0001	0,0431	0,0335

	Ti-6Al-4V	1x10 ¹⁶ Ag	5x10 ¹⁶ Ag	2x10 ¹⁷ Ag
53 - 55	0,0489	<0,0001	<0,0001	0,0001
53 - 61	0,0345	<0,0001	<0,0001	0,0014
53 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
53 - 95	0,0832	0,9918	0,0001	<0,0001
53 - 101	<0,0001	<0,0001	0,6278	0,0004
55 - 61	0,6800	<0,0001	0,8770	0,6204
55 - 74	0,0115	<0,0001	<0,0001	<0,0001
55 - 95	0,2790	<0,0001	<0,0001	<0,0001
55 - 101	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3320
61 - 74	0,0011	<0,0001	<0,0001	<0,0001
61 - 95	0,5567	<0,0001	<0,0001	<0,0001
61 - 101	<0,0001	0,0039	<0,0001	0,9424
74 - 95	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3375
74 - 101	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
95 - 101	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001

Tabla 21. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

1.2.5. YSZ con plata

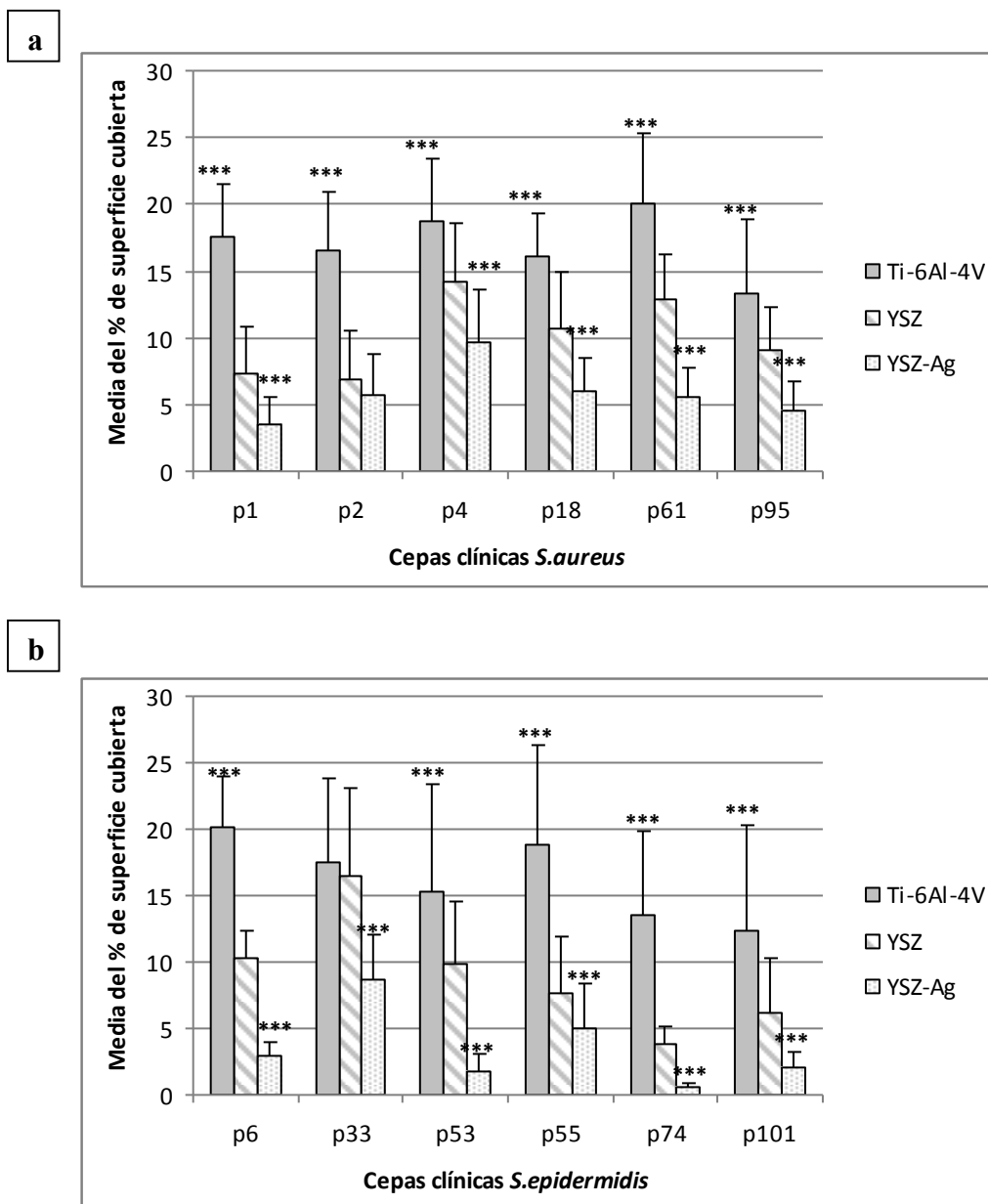


Figura 25. Porcentaje medio de la superficie de cada material cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

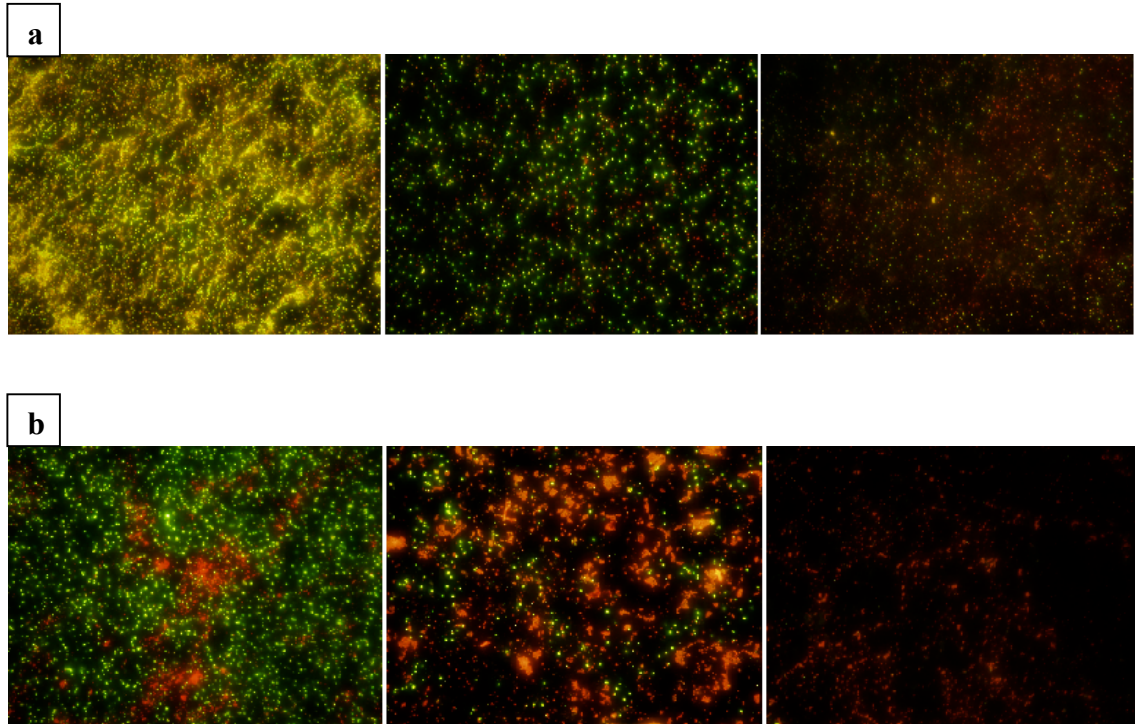


Figura 26. Ejemplo de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia para la superficie de Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V modificado con YSZ y Ti-6Al-4V modificado con YSZ-Ag cubiertos por a) cepa clínica p2 de *S. aureus* y b) cepa clínica p33 de *S. epidermidis*.

	<i>S. aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-4V vs YSZ	<0,0001	<0,0001	0,0027	0,0001	<0,0001	0,0112
Ti-6Al-4V vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
YSZ vs YSZ-AG	0,0002	0,3221	0,0016	0,0001	<0,0001	<0,0001
	<i>S. epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-4V vs YSZ	<0,0001	0,6724	0,0489	<0,0001	<0,0001	0,0012
Ti-6Al-4V vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
YSZ vs YSZ-AG	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0083	<0,0001	<0,0001

Tabla 22. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	YSZ	YSZ-Ag
1-2	0,4213	0,4767	0,0099
1 - 4	0,5498	<0,0001	<0,0001
1 - 6	0,0620	0,0021	0,9178
1 - 18	0,1608	0,0039	0,0017
1 - 33	0,5989	<0,0001	<0,0001
1 - 53	0,1903	0,0989	0,0009
1 - 55	0,4454	0,9589	0,0868
1 - 61	0,1219	<0,0001	0,0014
1 - 74	0,0172	<0,0001	<0,0001
1 - 95	0,0024	0,0432	0,1767
1 - 101	0,0057	0,0303	0,0830
2 - 4	0,2047	<0,0001	0,0006
2 - 6	0,0076	0,0007	0,0008
2 - 18	0,6800	0,0014	0,5361
2 - 33	0,8366	<0,0001	0,0076
2 - 53	0,2699	0,0266	<0,0001
2 - 55	0,2699	0,5093	0,2743
2 - 61	0,0363	<0,0001	0,9342
2 - 74	0,0761	0,0009	<0,0001
2 - 95	0,0288	0,0158	0,1670
2 - 101	0,0274	0,2236	<0,0001
4 - 6	0,1270	0,0007	<0,0001
4 - 18	0,0711	0,0049	0,0009
4 - 33	0,3172	0,2481	0,2824
4 - 53	0,0564	0,0043	<0,0001
4 - 55	1,0000	<0,0001	0,0003
4 - 61	0,5027	0,3751	0,0001
4 - 74	0,0052	<0,0001	<0,0001
4 - 95	0,0008	0,0001	<0,0001
4 - 101	0,0050	<0,0001	<0,0001
6 - 18	0,0004	0,4703	<0,0001
6 - 33	0,0304	0,0004	<0,0001
6 - 53	0,0296	0,6724	0,0005
6 - 55	0,4768	0,0061	0,0145
6 - 61	0,9343	0,0328	<0,0001
6 - 74	0,0007	<0,0001	<0,0001
6 - 95	<0,0001	0,2275	0,0033
6 - 101	0,0007	0,0001	0,0132
18 - 33	0,5226	0,0005	0,0071
18 - 53	0,3324	0,7414	<0,0001
18 - 55	0,1639	0,0052	0,1122
18 - 61	0,0096	0,0133	0,8608
18 - 74	0,0814	<0,0001	<0,0001
18 - 95	0,0192	0,3920	0,0744
18 - 101	0,0281	0,0002	<0,0001
33 - 53	0,1577	0,0009	<0,0001
33 - 55	0,4272	<0,0001	0,0003
33 - 61	0,0990	0,0328	0,0030
33 - 74	0,0363	<0,0001	<0,0001
33 - 95	0,0119	0,0001	<0,0001
33 - 101	0,0203	<0,0001	<0,0001

	Ti-6Al-4V	YSZ	YSZ-Ag
53 - 55	0,0870	0,1077	<0,0001
53 - 61	0,0328	0,0281	<0,0001
53 - 74	0,5847	<0,0001	0,0010
53 - 95	0,7414	0,6951	<0,0001
53 - 101	0,1404	0,0061	0,1899
55 - 61	0,5567	0,0001	0,1054
55 - 74	0,0177	0,0001	<0,0001
55 - 95	0,0122	0,0869	0,9097
55 - 101	0,0069	0,0948	0,0002
61 - 74	0,0010	<0,0001	<0,0001
61 - 95	0,0002	0,0055	0,0777
61 - 101	0,0006	<0,0001	<0,0001
74 - 95	0,7965	<0,0001	<0,0001
74 - 101	0,3273	0,0524	<0,0001
95 - 101	0,2929	0,0013	<0,0001

Tabla 23. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

2. PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS ADHERIDAS

2.1. Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas de colección

La incorporación de plata no afectó de la misma forma a todos los materiales y cepas:

- Produjo un aumento del porcentaje de bacterias muertas con respecto al material sin modificar en el caso de *S. aureus* para Ti-O y la plata implantada iónicamente. En el caso de *S. epidermidis* se produjo un aumento en todos los casos.
- *S. aureus* con respecto al material modificado mostró un aumento en el caso del DLC, mientras que en la modificación con YSZ este porcentaje disminuyó. Se encontraron diferencias entre las dos dosis más altas de plata implantada. Para *S. epidermidis* el porcentaje aumentó de forma estadística cuando incorporamos plata a Cu-Mn-O, YSZ y cuando dopamos el Ti-O con la dosis más alta. Además para *S. epidermidis* no encontramos diferencias entre las diversas modificaciones para la plata implantada iónicamente.

S. epidermidis es la cepa que mayor proporción de bacterias muertas presentó para todas las modificaciones que incorporaban plata, excepto en el caso de DLC-Ag y la plata implantada iónicamente. Además fue la cepa que mayor proporción de bacterias muertas presentó para DLC y Ti-O.

En los cinco estudios realizados la aleación de Ti-6Al-4V se comportó de forma diferente para cada una de las cepas de colección

2.1.1. Islas de plata

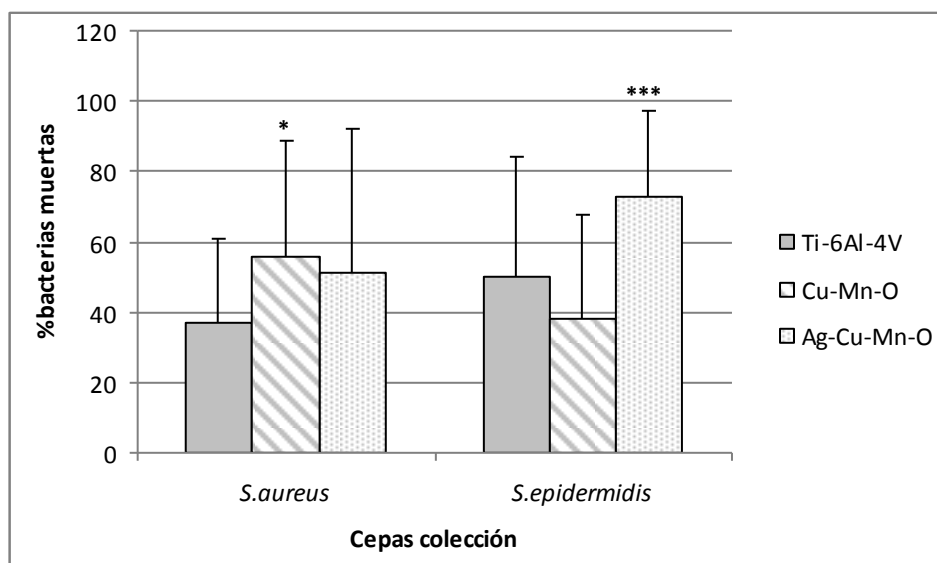


Figura 27. Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta por las cepas de colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. *Las diferencias con Ti-6Al-4V fueron estadísticamente significativas **Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	Valor de p	Valor de p
Ti-6Al-4V vs Ag-Cu-Mn-O	0,5619	0,0302
Ti-6Al-4V vs Cu-Mn-O	0,0420	0,2880
Cu-Mn-O vs Ag-Cu-Mn-O	0,6162	0,0001

Tabla 24. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	Cu-Mn-O	Ag-Cu-Mn-O
<i>S. aureus</i> vs <i>S. epidermidis</i>	0,2009	0,0574	0,0486

Tabla 25. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

2.1.2. DLC con plata

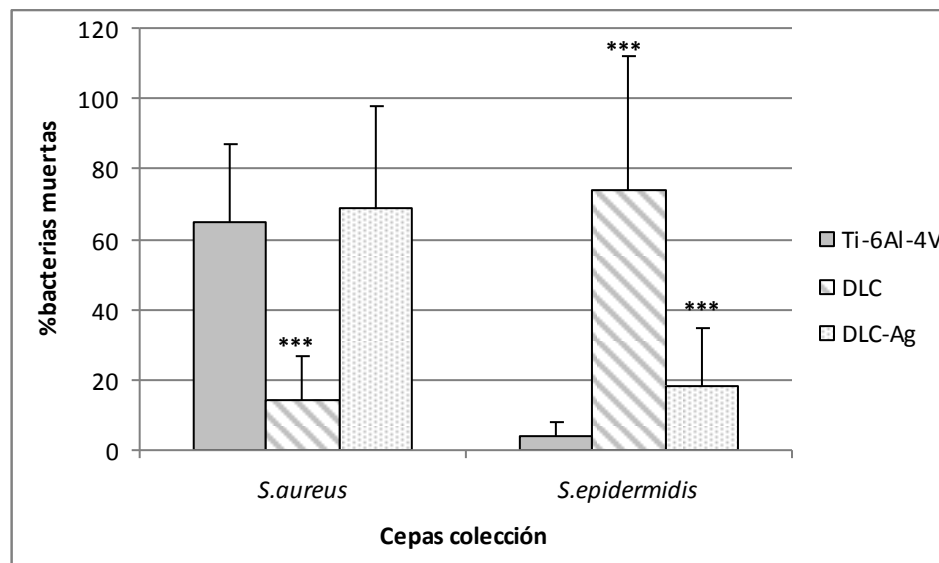


Figura 28. Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta por las cepas de colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	Valor de p	Valor de p
Ti-6Al-4V vs DLC	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-4V vs DLC-Ag	0,3527	<0,0001
DLC vs DLC-Ag	<0,0001	<0,0001

Tabla 26. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada bacteria.

	Ti-6Al-4V	DLC	DLC-Ag
<i>S. aureus</i> vs <i>S. epidermidis</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabla 27. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

2.1.3. Ti-O con plata

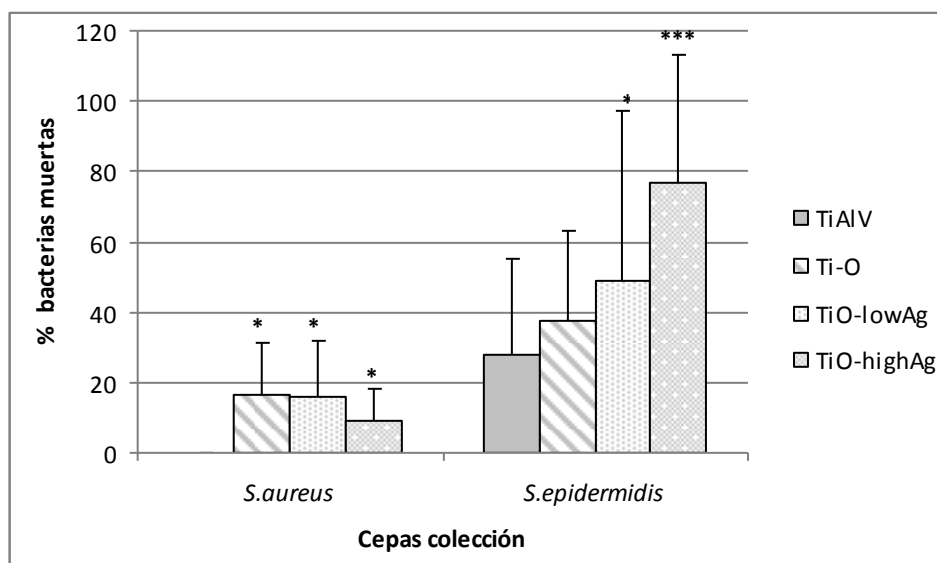


Figura 29. Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta por las cepas de colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. *Las diferencias con Ti-6Al-4V fueron estadísticamente significativas **Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	Valor p	Valor p
Ti-6Al-4V vs Ti-O	<0,0001	0,0649
Ti-6Al-4V vs TiO-low Ag	<0,0001	0,0013
Ti-6Al-4V vs TiO-high Ag	<0,0001	<0,0001
Ti-O vs TiO-low Ag	0,8120	0,1245
Ti-O vs TiO-high Ag	0,1034	0,0005
TiO-low Ag vs TiO-high Ag	0,1869	0,0039

Tabla 28. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa de colección.

	Ti-6Al-4V	Ti-O	TiO-lowAg	TiO-highAg
<i>S. aureus</i> vs <i>S. epidermidis</i>	<0,0001	0,0013	<0,0001	<0,0001

Tabla 29. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

2.1.4. Plata implantada iónicamente

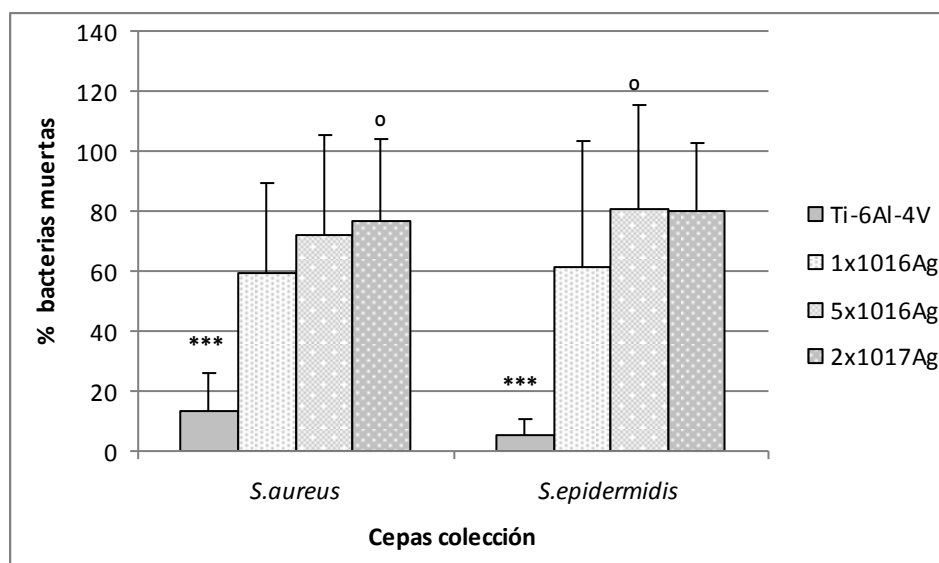


Figura 30. Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta por las cepas de colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas. ° Presenta diferencias estadísticas con 1×10^{16} Ag

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	Valor p	Valor p
Ti-6Al-4V vs 1×10^{16} Ag	<0,0001	0,0004
Ti-6Al-4V vs 5×10^{16} Ag	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-4V vs 2×10^{17} Ag	<0,0001	<0,0001
1×10^{16} vs 5×10^{16} Ag	0,2075	0,0174
1×10^{16} vs 2×10^{17} Ag	0,0341	0,2061
5×10^{16} vs 2×10^{17} Ag	0,5555	0,2775

Tabla 30. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa de colección.

	Ti-6Al-4V	1×10^{16} Ag	5×10^{16} Ag	2×10^{17} Ag
<i>S. aureus</i> vs <i>S. epidermidis</i>	0,0143	0,6982	0,2404	0,7576

Tabla 31. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

2.1.5. YSZ con plata

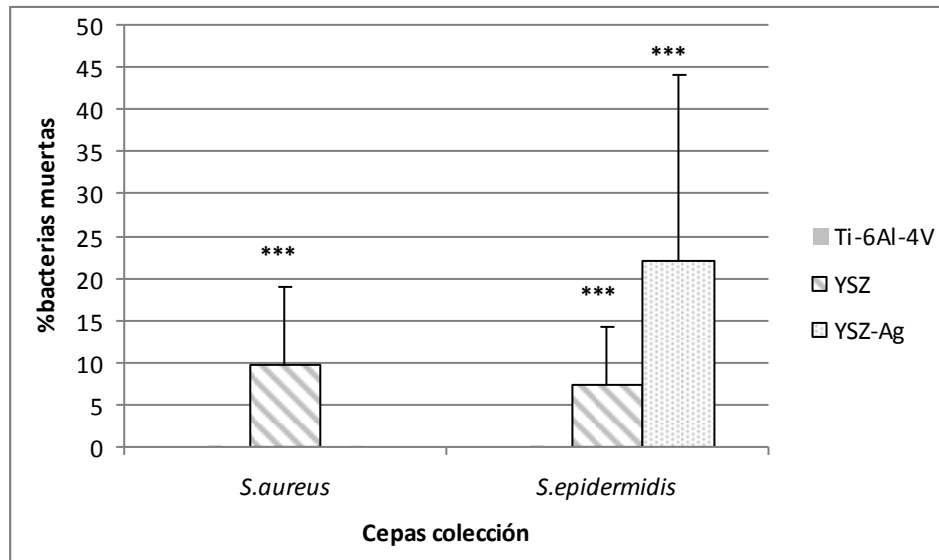


Figura 31. Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta por las cepas de colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	Valor p	Valor p
Ti-6Al-4V vs YSZ	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-4V vs YSZ-Ag		<0,0001
YSZ vs YSZ-AG	<0,0001	0,0014

Tabla 32. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa de colección.

	Ti-6Al-4V	YSZ	YSZ-Ag
<i>S. aureus</i> vs <i>S. epidermidis</i>		0,4147	<0,0001

Tabla 33. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las dos cepas de colección para cada superficie.

2.2. Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas clínicas

Se encontró un aumento de este porcentaje cuando se incorporó la plata a:

- DLC, excepto en 3 cepas clínicas (p2, p53 y p61) al compararlo con el material sin modificar, y en cuatro cepas (p61, p95, p6 y p101) cuando se comparó al material modificado sin plata.
- En el caso de la plata implantada, excepto en una sola cepa clínica (p18) cuando se comparó con Ti-6Al-4V.
- YSZ sólo para la mitad de las cepas clínicas (p6, p18, p33, p74, p101 y p55) al compararlo con Ti-6-Al-4V, pero al compararlo con el material sin modificar no se encontró este aumento en la mayoría de los casos.
- Cu-Mn-O en la mitad de las cepas clínicas (p2, p18, p61, p95, p33 y p55) con respecto al material modificado.

Entre los materiales modificados con plata:

- Para la mayoría de cepas clínicas (p4, p18, p6, p53, p55, p74 y p101) no existieron diferencias estadísticas entre TiO-lowAg y TiO-highAg, para las demás cepas el comportamiento es variable.
- Para 8 cepas clínicas (p2, p4, p18, p95, p33, p53, p55 y p101) no existieron diferencias estadísticas entre las dos dosis mas bajas de plata implantada. En siete cepas clínicas (p1, p2, p4, p61, p95, p53 y p101) la dosis más alta presentó mayor proporción de forma estadística que la dosis más baja. En la mitad de la cepas clínicas (p1, p2, p4, p95, p74 y p101) no existieron diferencias estadísticas entre las dosis más altas.

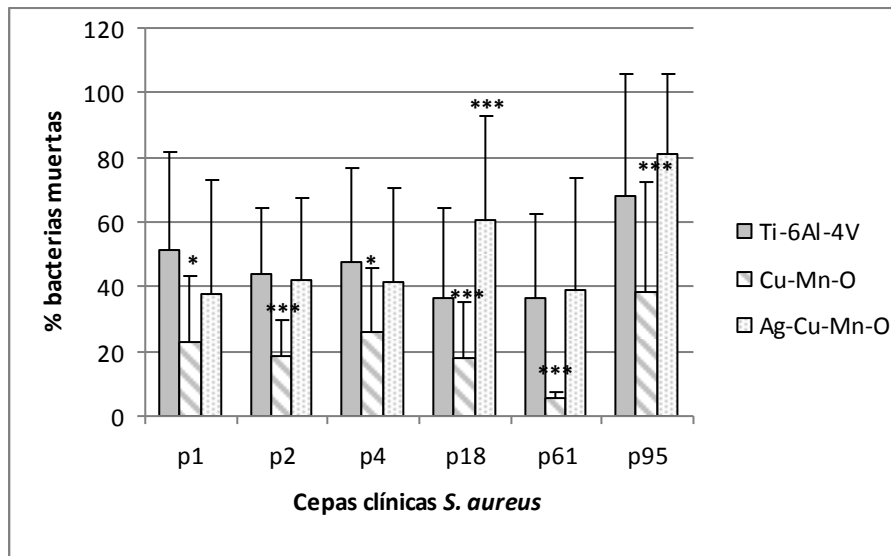
Al comparar las modificaciones sin plata y la aleación de Ti-6Al-4V:

- En la mayoría de los casos, la aleación de Ti-6Al-4V presentó un porcentaje mayor que la modificación con Cu-Mn-O o Ti-O.
- La modificación con DLC mostró un aumento en la mayoría de los casos.
- En cinco cepas (p2, p61, p33, p53 y p55) la incorporación de YSZ mostró un aumento de este porcentaje.

Aunque el comportamiento de cada cepa fue variable con respecto a cada material encontramos que por lo general las cepas p4, p95 y p101 fueron las que mayor proporción de bacterias muertas presentaron para los diferentes materiales.

2.2.1. Islas de plata

a



b

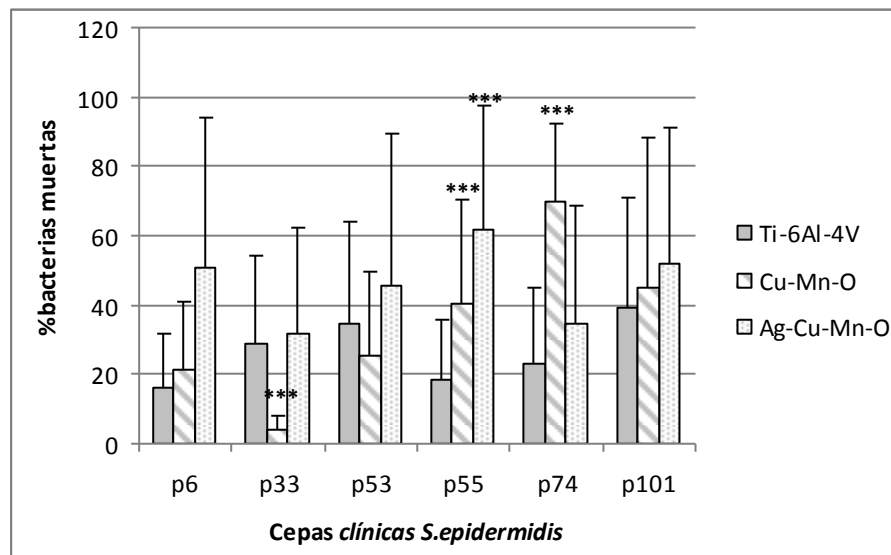


Figura 32 Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. *Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a Ti-6Al-4V ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas

	S.aureus					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-4V vs Ag-Cu-Mn-O	0,2273	0,2878	0,4829	0,0104	0,6720	0,2084
Ti-6Al-4V vs Cu-Mn-O	0,0009	0,0001	0,0133	0,0140	0,0003	0,0152
Cu-Mn-O vs Ag-Cu-Mn-O	0,1489	<0,0001	0,0632	<0,0001	<0,0001	0,0001
	S.epidermidis					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-4V vs Ag-Cu-Mn-O	0,1470	0,9637	0,5339	<0,0001	0,3215	0,2434
Ti-6Al-4V vs Cu-Mn-O	0,5104	0,0001	0,3368	0,0137	<0,0001	0,7861
Cu-Mn-O vs Ag-Cu-Mn-O	0,0841	0,0101	0,2717	0,0233	0,0005	0,8122

Tabla 34. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

	Ti-6Al-4V	Cu-Mn-O	Ag-Cu-Mn-O
1-2	0,1869	0,8603	0,2224
1 - 4	0,8461	0,4672	0,2426
1 - 6	0,0003	0,9274	0,6169
1 - 18	0,0501	0,5512	0,0154
1 - 33	0,0081	0,0015	0,3736
1 - 53	0,0320	0,6592	0,9170
1 - 55	0,0002	0,0500	0,0234
1 - 61	0,0455	0,0121	0,5618
1 - 74	0,0021	<0,0001	0,8200
1 - 95	0,0403	0,1489	0,0001
1 - 101	0,1835	0,1853	0,2952
2 - 4	0,6575	0,1868	0,6639
2 - 6	<0,0001	0,9491	0,7242
2 - 18	0,1295	0,4451	0,0174
2 - 33	0,0259	<0,0001	0,1753
2 - 53	0,1799	0,8204	0,5821
2 - 55	0,0001	0,0039	0,0868
2 - 61	0,2121	<0,0001	0,1653
2 - 74	0,0009	<0,0001	0,1288
2 - 95	0,0067	0,0812	<0,0001
2 - 101	0,4393	0,6285	0,5905
4 - 6	0,0001	0,3998	0,7241
4 - 18	0,2011	0,1313	0,0210
4 - 33	0,0215	<0,0001	0,1385
4 - 53	0,1146	0,5984	0,6035
4 - 55	0,0006	0,1121	0,0887
4 - 61	0,2655	0,0001	0,6864
4 - 74	0,0027	<0,0001	0,2344
4 - 95	0,0261	0,4511	<0,0001
4 - 101	0,2482	0,4863	0,6268
6 - 18	0,0265	0,5357	0,4533
6 - 33	0,1985	0,0005	0,2066
6 - 53	0,1686	0,6930	0,9747
6 - 55	0,7520	0,0214	0,2319
6 - 61	0,0465	0,0014	0,7384
6 - 74	0,3058	0,0000	0,3757
6 - 95	0,0003	0,1274	0,0133
6 - 101	0,0778	0,2180	0,9002
18 - 33	0,3273	0,0034	0,0074
18 - 53	0,8446	0,4079	0,1562
18 - 55	0,0209	0,0056	0,9336
18 - 61	0,9015	0,0201	0,0162
18 - 74	0,0634	0,0000	0,0072
18 - 95	0,0084	0,0417	0,0187
18 - 101	0,7571	0,1057	0,3248
33 - 53	0,5916	0,0005	0,2867
33 - 55	0,1904	<0,0001	0,0020
33 - 61	0,2835	0,0311	0,3554
33 - 74	0,5025	<0,0001	0,6646
33 - 95	0,0007	0,0001	<0,0001
33 - 101	0,2929	0,0005	0,0807

	Ti-6Al-4V	Cu-Mn-O	Ag-Cu-Mn-O
53 - 55	0,0782	0,0742	0,1197
53 - 61	0,9178	0,0031	0,8427
53 - 74	0,1935	<0,0001	0,6321
53 - 95	0,0026	0,2190	0,0058
53 - 101	0,5292	0,2934	0,7302
55 - 61	0,0248	<0,0001	0,0443
55 - 74	0,5304	0,0006	0,0135
55 - 95	0,0001	0,6645	0,0512
55 - 101	0,0328	0,8779	0,2786
61 - 74	0,0831	<0,0001	0,4435
61 - 95	0,0034	0,0007	0,0001
61 - 101	0,7965	0,0253	0,3397
74 - 95	0,0003	0,0012	<0,0001
74 - 101	0,0948	0,0999	0,1990
95 - 101	0,0086	0,8775	0,0051

Tabla 35. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

2.2.2. DLC con plata

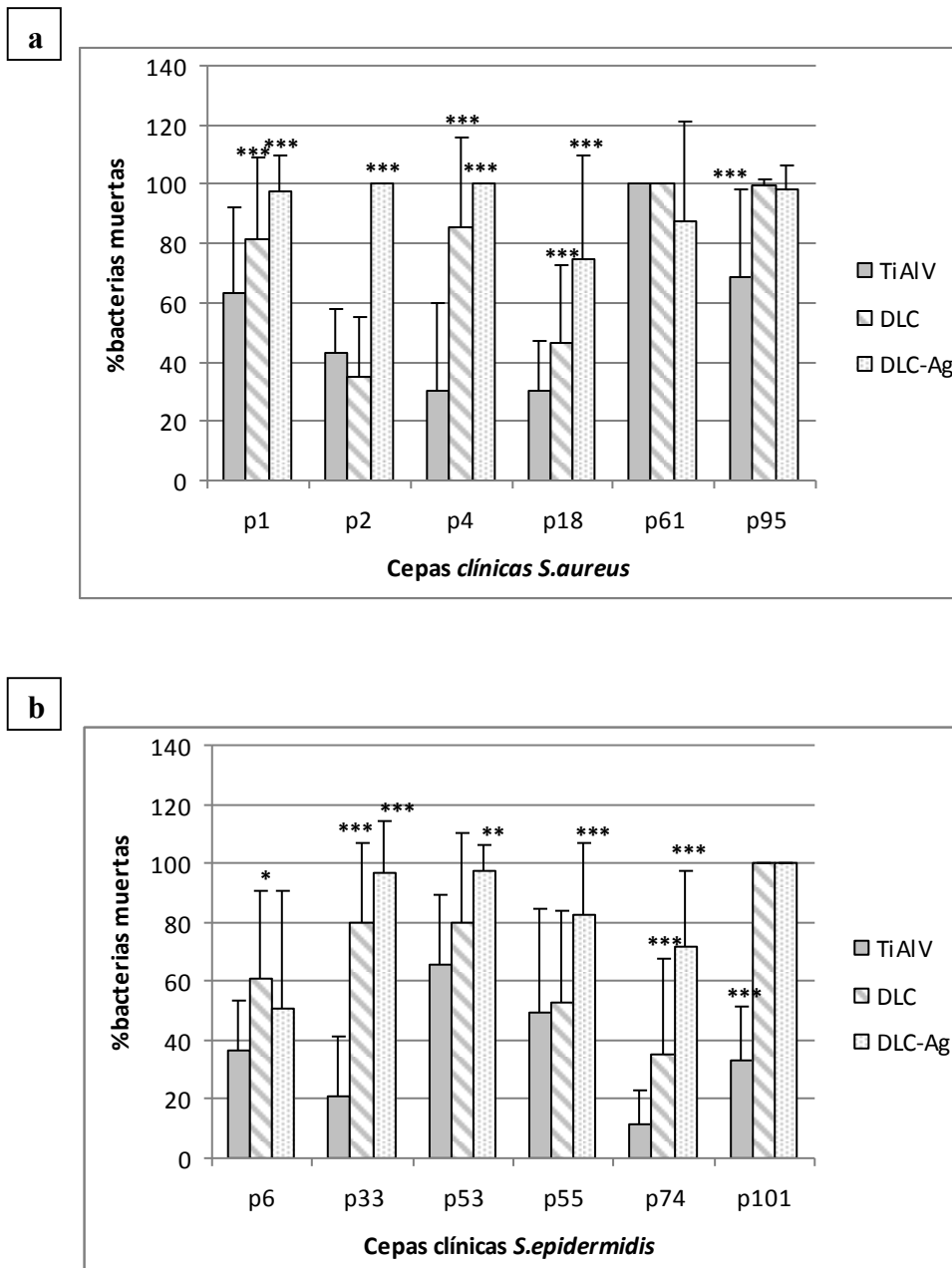


Figura 33 Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. *Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a Ti-6Al-4V ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas

	<i>S.aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-4V vs DLC	0,0323	0,0565	<0,0001	0,0346		0,0004
Ti-6Al-4V vs DLC-Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0809	0,0003
DLC vs DLC-Ag	0,0108	<0,0001	0,0207	0,0019	0,0809	0,6059
	<i>S.epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-4V vs DLC	0,0015	<0,0001	0,0566	0,6113	0,0122	<0,0001
Ti-6Al-4V vs DLC-Ag	0,4032	<0,0001	0,0845	0,0012	<0,0001	<0,0001
DLC vs DLC-Ag	0,5021	0,0065	0,0132	0,0015	0,0002	

Tabla 36. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

	Ti-6Al-4V	DLC	DLC-Ag
1-2	0,0180	<0,0001	0,3379
1 - 4	0,0006	0,4173	0,3379
1 - 6	0,0011	0,0069	<0,0001
1 - 18	0,0001	0,0001	0,0014
1 - 33	<0,0001	0,5153	0,1529
1 - 53	0,6319	0,9449	0,6059
1 - 55	0,1043	0,0020	0,0034
1 - 61	<0,0001	0,0026	0,2820
1 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1 - 95	0,4750	0,0128	1,0000
1 - 101	0,0002	0,0026	0,3379
2 - 4	0,0674	<0,0001	
2 - 6	0,1432	0,0015	<0,0001
2 - 18	0,0063	0,1518	0,0002
2 - 33	0,0001	<0,0001	0,0457
2 - 53	0,0004	<0,0001	0,1617
2 - 55	0,9918	0,0411	0,0005
2 - 61	<0,0001	<0,0001	0,0809
2 - 74	<0,0001	0,4897	<0,0001
2 - 95	0,0057	<0,0001	0,3379
2 - 101	0,0122	<0,0001	
4 - 6	0,3010	0,0006	<0,0001
4 - 18	0,5698	0,0001	0,0002
4 - 33	0,6416	0,0322	0,0457
4 - 53	0,0001	0,3292	0,1617
4 - 55	0,0426	0,0009	0,0005
4 - 61	<0,0001	0,0207	0,0809
4 - 74	0,1222	<0,0001	<0,0001
4 - 95	0,0001	0,1737	0,3379
4 - 101	0,4695	0,0207	
6 - 18	0,2143	0,0635	0,0399
6 - 33	0,0026	0,0093	0,0001
6 - 53	<0,0001	0,0104	<0,0001
6 - 55	0,3693	0,3119	0,0035
6 - 61	<0,0001	<0,0001	0,0005
6 - 74	<0,0001	0,0069	0,1332
6 - 95	0,0003	<0,0001	<0,0001
6 - 101	0,2836	<0,0001	<0,0001
18 - 33	0,0304	0,0003	0,0414
18 - 53	<0,0001	0,0004	0,0032
18 - 55	0,0906	0,5562	0,6907
18 - 61	<0,0001	<0,0001	0,0351
18 - 74	0,0001	0,0850	0,1671
18 - 95	<0,0001	<0,0001	0,0011
18 - 101	0,6062	<0,0001	0,0002
33 - 53	<0,0001	0,4085	0,2962
33 - 55	0,0015	0,0073	0,0846
33 - 61	<0,0001	<0,0001	0,6421
33 - 74	0,1076	0,0001	0,0001
33 - 95	<0,0001	0,0001	0,1440
33 - 101	0,0065	<0,0001	0,0457

	Ti-6Al-4V	DLC	DLC-Ag
53 - 55	0,0358	0,0047	0,0070
53 - 61	<0,0001	0,0011	0,5727
53 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
53 - 95	0,9416	0,0096	0,6059
53 - 101	<0,0001	0,0011	0,1617
55 - 61	<0,0001	<0,0001	0,0711
55 - 74	<0,0001	0,0409	0,0539
55 - 95	0,0327	<0,0001	0,0024
55 - 101	0,1544	<0,0001	0,0005
61 - 74	<0,0001	<0,0001	0,0001
61 - 95	0,0001	0,1617	0,2820
61 - 101	<0,0001		0,0809
74 - 95	<0,0001	<0,0001	<0,0001
74 - 101	<0,0001	<0,0001	<0,0001
95 - 101	<0,0001	0,1617	0,3379

Tabla 37. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

2.2.3. Ti-O con plata

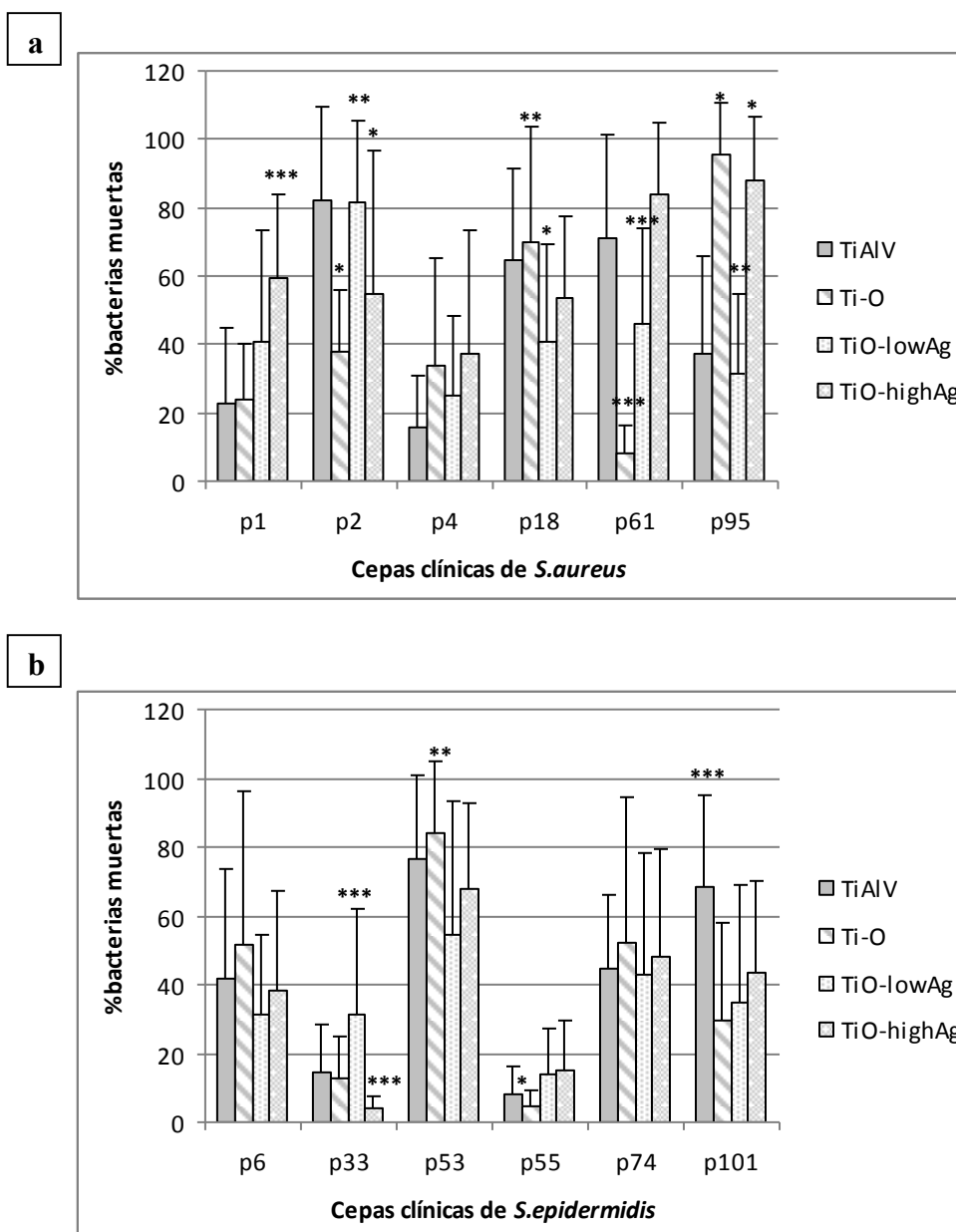


Figura 34 Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. *Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a Ti-6Al-4V **Las diferencias con respecto a los materiales modificados fueron estadísticamente significativas ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas

	<i>S.aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-4V vs Ti-O	0,6499	0,0000	0,3669	0,3514	<0,0001	<0,0001
Ti-6Al-4V vs Ti-O-low Ag	0,0905	0,7830	0,1509	0,0064	0,0094	0,4895
Ti-6Al-4V vs Ti-O-high Ag	<0,0001	0,0241	0,1010	0,1938	0,1523	<0,0001
Ti-O vs Ti-O-low Ag	0,0671	0,0000	0,4830	0,0022	<0,0001	<0,0001
Ti-O vs Ti-O-high Ag	<0,0001	0,1937	0,3605	0,0444	<0,0001	0,0549
Ti-O-low Ag vs Ti-O-high Ag	0,0301	0,0315	0,4138	0,0525	0,0001	0,0000
	<i>S.epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-4V vs Ti-O	0,7394	0,7487	0,1685	0,1598	0,7093	0,0001
Ti-6Al-4V vs Ti-O-low Ag	0,2653	0,0083	0,0593	0,2626	0,6497	0,0014
Ti-6Al-4V vs Ti-O-high Ag	0,8284	0,0001	0,1721	0,0822	0,7648	0,0031
Ti-O vs Ti-O-low Ag	0,4372	0,0078	0,0048	0,0216	0,4383	0,8117
Ti-O vs Ti-O-high Ag	0,2753	0,0035	0,0081	0,0013	0,8837	0,0744
Ti-O-low Ag vs Ti-O-high Ag	0,3750	<0,0001	0,4759	0,4952	0,6196	0,2972

Tabla 38. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

	Ti-6Al-4V	Ti-O	TiO-highAg	TiO-lowAg
1-2	<0,0001	0,0088	<0,0001	0,8523
1 - 4	0,5498	0,3932	0,0634	0,0487
1 - 6	0,0112	0,1880	0,3918	0,0144
1 - 18	<0,0001	<0,0001	0,8607	0,4151
1 - 33	0,5226	0,0072	0,2694	<0,0001
1 - 53	<0,0001	<0,0001	0,1648	0,2192
1 - 55	0,0148	<0,0001	0,0055	<0,0001
1 - 61	<0,0001	0,0003	0,5425	0,0010
1 - 74	0,0013	0,0520	0,8927	0,0641
1 - 95	0,1294	<0,0001	0,3167	0,0001
1 - 101	<0,0001	0,8687	0,5068	0,0562
2 - 4	<0,0001	0,6195	<0,0001	0,1931
2 - 6	0,0003	0,5693	<0,0001	0,0963
2 - 18	0,0106	0,0020	0,0001	0,7412
2 - 33	<0,0001	<0,0001	0,0000	0,0001
2 - 53	0,1942	<0,0001	0,0098	0,3968
2 - 55	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0105
2 - 61	0,3513	<0,0001	0,0002	0,0076
2 - 74	<0,0001	0,4623	0,0004	0,9011
2 - 95	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0021
2 - 101	0,0328	0,0888	<0,0001	0,3745
4 - 6	0,0003	0,0615	0,2155	1,0000
4 - 18	<0,0001	0,0022	0,0162	0,0591
4 - 33	0,9260	0,1587	0,8124	0,0002
4 - 53	<0,0001	<0,0001	0,0156	0,0027
4 - 55	0,0572	0,0660	0,1247	0,0776
4 - 61	<0,0001	0,0650	0,0060	<0,0001
4 - 74	<0,0001	0,1175	0,0520	0,1165
4 - 95	0,0075	<0,0001	0,3215	<0,0001
4 - 101	<0,0001	0,9834	0,6401	0,4703
6 - 18	0,0157	0,1579	0,1938	0,0795
6 - 33	0,0007	0,0243	0,3977	0,0001
6 - 53	0,0004	0,0244	0,0811	0,0008
6 - 55	<0,0001	0,0007	0,0031	0,0131
6 - 61	0,0031	0,0034	0,0465	<0,0001
6 - 74	0,4036	1,0000	0,3117	0,4448
6 - 95	0,6425	0,0002	0,9507	<0,0001
6 - 101	0,0058	0,1679	0,6498	0,5291
18 - 33	<0,0001	<0,0001	0,0905	<0,0001
18 - 53	0,1089	0,2851	0,3163	0,0525
18 - 55	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001
18 - 61	0,3287	<0,0001	0,3167	0,0001
18 - 74	0,0163	0,1279	0,8283	0,2740
18 - 95	0,0018	0,0028	0,2276	<0,0001
18 - 101	0,5842	0,0002	0,3020	0,1834
33 - 53	<0,0001	<0,0001	0,1860	<0,0001
33 - 55	0,0841	0,0073	0,0065	0,0001
33 - 61	<0,0001	0,2564	0,0214	<0,0001
33 - 74	<0,0001	0,0051	0,3419	<0,0001
33 - 95	0,0029	<0,0001	0,1902	<0,0001
33 - 101	<0,0001	0,0426	0,6721	<0,0001

	Ti-6Al-4V	Ti-O	TiO-highAg	TiO-lowAg
53 - 55	<0,0001	<0,0001	0,0020	<0,0001
53 - 61	0,7140	<0,0001	0,4384	0,0191
53 - 74	0,0001	0,0182	0,2846	0,0350
53 - 95	<0,0001	0,0108	0,0828	0,0026
53 - 101	0,2956	<0,0001	0,0927	0,0018
55 - 61	<0,0001	0,1735	<0,0001	<0,0001
55 - 74	<0,0001	0,0007	0,0056	<0,0001
55 - 95	0,0001	<0,0001	0,0041	<0,0001
55 - 101	<0,0001	0,0003	0,0949	0,0004
61 - 74	0,0042	0,0008	0,5911	0,0002
61 - 95	0,0005	<0,0001	0,0619	0,5042
61 - 101	0,5321	0,0049	0,1240	<0,0001
74 - 95	0,1800	0,0002	0,2827	0,0001
74 - 101	0,0018	0,0756	0,5193	0,9096
95 - 101	0,0005	<0,0001	0,6570	<0,0001

Tabla 39. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

2.2.4. Plata implantada iónicamente

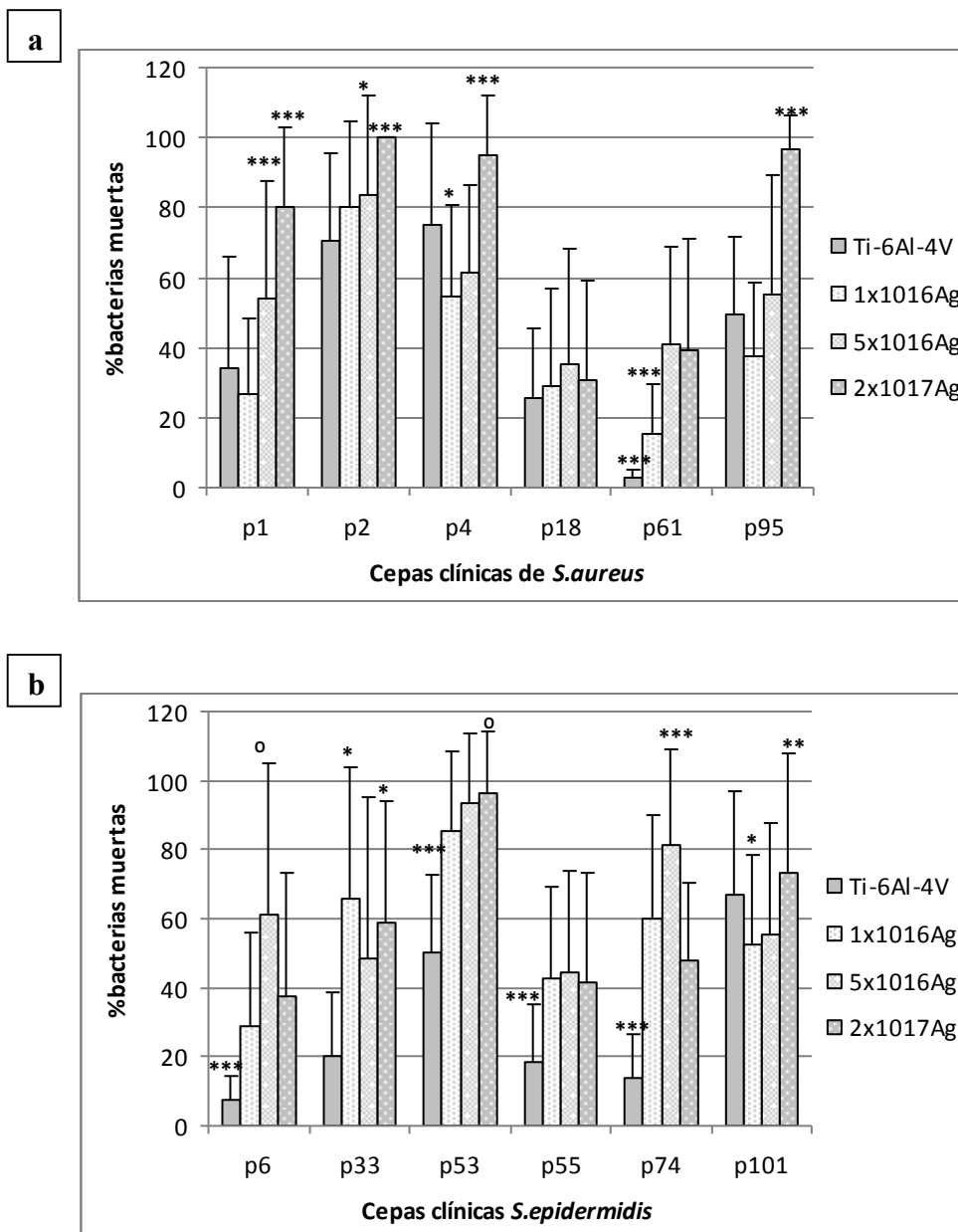


Figura 35 Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. *Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a Ti-6Al-4V**Las diferencias con respecto a los materiales modificados fueron estadísticamente significativas ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas. ° Las diferencias con 1x10¹⁶Ag fueron estadísticamente significativas.

	<i>S.aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-4V vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,6794	0,1390	0,0248	0,9175	0,0007	0,0565
Ti-6Al-4V vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0230	0,0487	0,1238	0,6498	<0,0001	1,0000
Ti-6Al-4V vs 2x10 ¹⁷ Ag	<0,0001	<0,0001	0,0045	0,8125	<0,0001	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0044	0,5072	0,3573	0,4863	0,0002	0,1028
1x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,8117	0,0082	<0,0001
5x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0055	0,0005	<0,0001	0,8933	0,6875	<0,0001
	<i>S.epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-4V vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,0015	0,0002	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,0413
Ti-6Al-4V vs 5x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,4722	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,3637
Ti-6Al-4V vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0032	0,0001	<0,0001	0,0017	<0,0001	0,4574
1x10 ¹⁶ Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0257	0,1057	0,1366	0,9589	0,0114	0,5158
1x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,6420	0,5094	0,0260	0,6132	0,1512	0,0079
5x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0590	0,2221	0,3440	0,6132	0,0001	0,0418

Tabla 40. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

	Ti-6Al-4V	1x10 ¹⁶ Ag	5x10 ¹⁶ Ag	2x10 ¹⁷ Ag
1-2	0,0003	<0,0001	0,0069	0,0001
1 - 4	0,0001	0,0005	0,2707	0,0045
1 - 6	0,0020	0,9014	0,8809	0,0001
1 - 18	0,6722	0,9834	0,0316	<0,0001
1 - 33	0,1831	0,0010	0,2863	0,0172
1 - 53	0,0203	<0,0001	0,0001	0,0009
1 - 55	0,3272	0,0477	0,2509	<0,0001
1 - 61	<0,0001	0,0641	0,1626	<0,0001
1 - 74	0,0386	0,0002	0,0067	<0,0001
1 - 95	0,0392	0,0679	1,0000	0,0038
1 - 101	0,0012	0,0012	0,7478	0,7386
2 - 4	0,5200	0,0019	0,0060	0,1617
2 - 6	<0,0001	<0,0001	0,2325	<0,0001
2 - 18	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2 - 33	<0,0001	0,2076	0,0017	<0,0001
2 - 53	0,0104	0,3992	0,0362	0,3379
2 - 55	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001
2 - 61	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2 - 74	<0,0001	0,0136	0,9907	<0,0001
2 - 95	0,0056	<0,0001	0,0083	0,0811
2 - 101	0,6578	0,0003	0,0019	0,0002
4 - 6	<0,0001	0,0006	0,9662	<0,0001
4 - 18	<0,0001	0,0014	0,0036	<0,0001
4 - 33	<0,0001	0,3025	0,4658	<0,0001
4 - 53	0,0038	0,0003	<0,0001	0,6059
4 - 55	<0,0001	0,0848	0,0231	<0,0001
4 - 61	<0,0001	<0,0001	0,0080	<0,0001
4 - 74	<0,0001	0,6264	0,0156	<0,0001
4 - 95	0,0025	0,0239	0,2362	0,7410
4 - 101	0,3743	0,5566	0,7642	0,0046
6 - 18	0,0005	0,8764	0,0241	0,8123
6 - 33	0,0078	0,0030	0,0170	0,0281
6 - 53	<0,0001	<0,0001	0,0055	<0,0001
6 - 55	0,0020	0,0311	0,2326	0,4087
6 - 61	0,0011	0,1115	0,1836	0,7178
6 - 74	0,1447	0,0004	0,1344	0,0648
6 - 95	<0,0001	0,0695	0,9063	<0,0001
6 - 101	<0,0001	0,0015	0,3756	0,0016
18 - 33	0,2743	0,0022	0,7216	0,0084
18 - 53	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001
18 - 55	0,2398	0,0643	0,1459	0,1972
18 - 61	<0,0001	0,1420	0,3072	0,4514
18 - 74	0,0399	0,0013	<0,0001	0,0055
18 - 95	0,0007	0,1894	0,0368	<0,0001
18 - 101	<0,0001	0,0062	0,0615	0,0003
33 - 53	<0,0001	0,0399	<0,0001	<0,0001
33 - 55	0,8366	0,0326	0,8273	0,0735
33 - 61	<0,0001	<0,0001	0,9420	0,0301
33 - 74	0,3527	0,5718	0,0027	0,3801
33 - 95	<0,0001	0,0078	0,2502	<0,0001
33 - 101	<0,0001	0,0979	0,7533	0,1227

	Ti-6Al-4V	1x10 ¹⁶ Ag	5x10 ¹⁶ Ag	2x10 ¹⁷ Ag
53 - 55	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
53 - 61	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
53 - 74	<0,0001	0,0030	0,0652	<0,0001
53 - 95	0,8934	<0,0001	0,0001	0,3440
53 - 101	0,0649	<0,0001	<0,0001	0,0017
55 - 61	<0,0001	<0,0001	0,7886	0,7570
55 - 74	0,2196	0,0378	0,0001	0,1219
55 - 95	<0,0001	0,6575	0,2383	<0,0001
55 - 101	<0,0001	0,1939	0,1831	0,0033
61 - 74	0,0018	<0,0001	<0,0001	0,2160
61 - 95	<0,0001	0,0003	0,0879	<0,0001
61 - 101	<0,0001	<0,0001	0,0742	0,0011
74 - 95	<0,0001	0,0093	0,0067	<0,0001
74 - 101	<0,0001	0,2878	0,0051	0,0073
95 - 101	0,0761	0,0513	0,7556	0,0065

Tabla 41. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

2.2.5. YSZ con plata

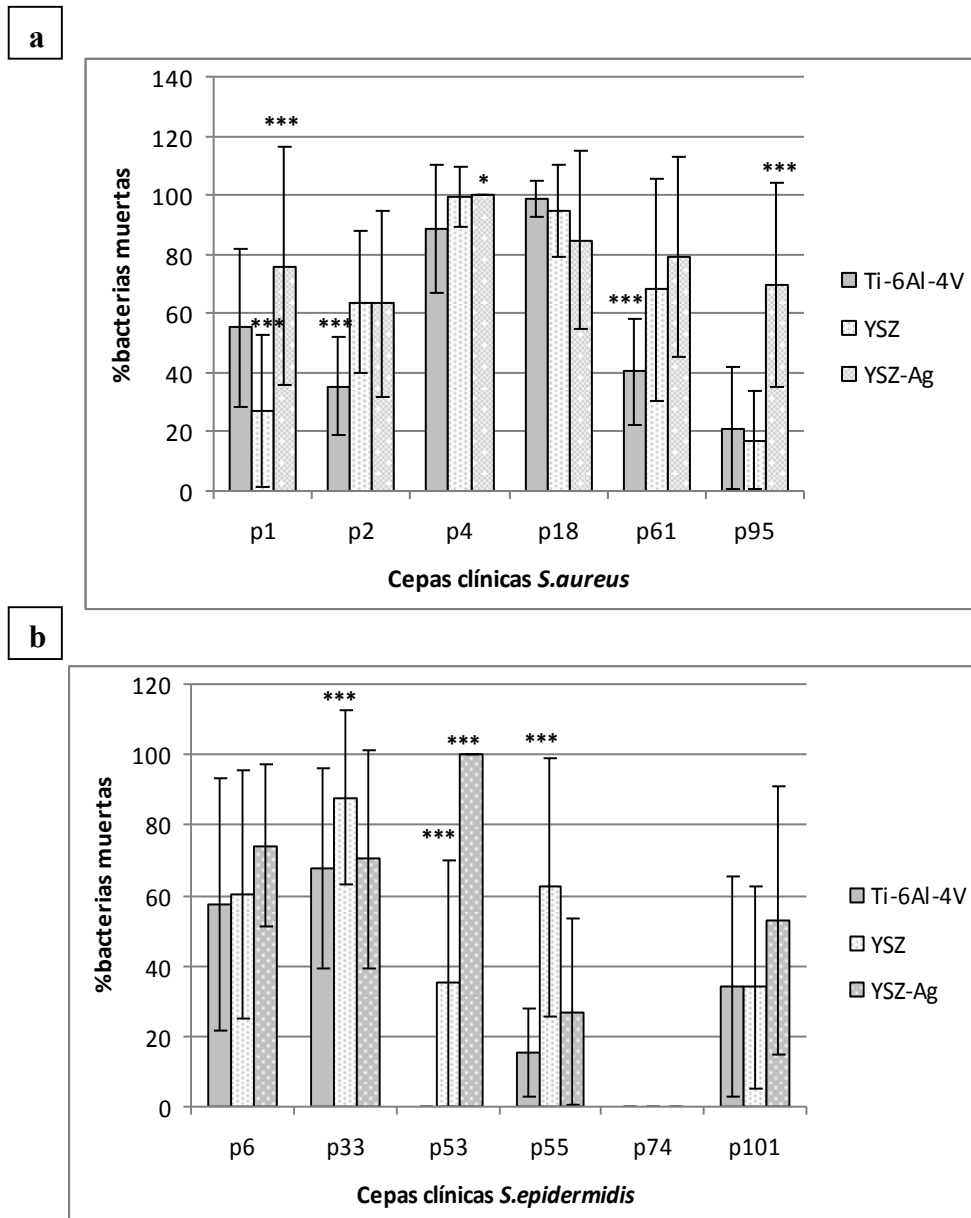


Figura 36 Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. *Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a Ti-6Al-4V ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

	<i>S.aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ti-6Al-4V vs YSZ	0,0008	0,0001	0,0716	0,2437	0,0116	0,6853
Ti-6Al-4V vs YSZ-Ag	0,0307	0,0015	0,0103	0,1878	0,0001	<0,0001
YSZ vs YSZ-Ag	0,0002	0,8931	0,5720	0,7759	0,2640	<0,0001
	<i>S.epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ti-6Al-4V vs YSZ	0,7614	0,0035	<0,0001	<0,0001		0,7258
Ti-6Al-4V vs YSZ-Ag	0,1274	0,6879	<0,0001	0,1122		0,0888
YSZ vs YSZ-Ag	0,1978	0,0320	<0,0001	0,0004		0,0837

Tabla 42. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

	Ti-6Al-4V	YSZ	YSZ-Ag
1-2	0,0049	<0,0001	0,1637
1 - 4	<0,0001	<0,0001	0,0010
1 - 6	0,8037	0,0010	0,4307
1 - 18	<0,0001	<0,0001	0,1834
1 - 33	0,0769	<0,0001	0,6202
1 - 53	<0,0001	0,6624	0,0010
1 - 55	<0,0001	0,0021	0,0004
1 - 61	0,0578	0,0006	0,4696
1 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1 - 95	<0,0001	0,2834	0,6074
1 - 101	0,0041	0,4890	0,1019
2 - 4	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2 - 6	0,0250	0,8684	0,2607
2 - 18	<0,0001	<0,0001	0,0046
2 - 33	0,0001	0,0001	0,3024
2 - 53	<0,0001	0,0023	<0,0001
2 - 55	<0,0001	0,9253	0,0002
2 - 61	0,2790	0,2917	0,0345
2 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2 - 95	0,0050	<0,0001	0,3814
2 - 101	0,1376	0,0005	0,3978
4 - 6	0,0007	<0,0001	<0,0001
4 - 18	0,1778	0,0871	0,0103
4 - 33	0,0024	0,0670	<0,0001
4 - 53	<0,0001	<0,0001	
4 - 55	<0,0001	0,0003	<0,0001
4 - 61	<0,0001	0,0007	0,0024
4 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4 - 95	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4 - 101	<0,0001	<0,0001	<0,0001
6 - 18	<0,0001	0,0005	0,0239
6 - 33	0,2834	0,0036	0,8959
6 - 53	<0,0001	0,0141	<0,0001
6 - 55	<0,0001	0,7657	<0,0001
6 - 61	0,0707	0,4473	0,1131
6 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
6 - 95	0,0004	<0,0001	0,8989
6 - 101	0,0187	0,0112	0,0433
18 - 33	<0,0001	0,7967	0,0668
18 - 53	<0,0001	<0,0001	0,0103
18 - 55	<0,0001	0,0065	<0,0001
18 - 61	<0,0001	0,0195	0,4962
18 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
18 - 95	<0,0001	<0,0001	0,0703
18 - 101	<0,0001	<0,0001	0,0048
33 - 53	<0,0001	<0,0001	<0,0001
33 - 55	<0,0001	0,0156	<0,0001
33 - 61	0,0004	0,0426	0,2292
33 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
33 - 95	<0,0001	<0,0001	0,9555
33 - 101	0,0011	<0,0001	0,0982

	Ti-6Al-4V	YSZ	YSZ-Ag
53 - 55	<0,0001	0,0106	<0,0001
53 - 61	<0,0001	0,0052	0,0024
53 - 74		<0,0001	<0,0001
53 - 95	<0,0001	0,1325	<0,0001
53 - 101	<0,0001	0,7489	<0,0001
55 - 61	<0,0001	0,7184	<0,0001
55 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
55 - 95	0,5480	<0,0001	0,0001
55 - 101	0,0232	0,0060	0,0158
61 - 74	<0,0001	<0,0001	<0,0001
61 - 95	0,0022	<0,0001	0,2603
61 - 101	0,0538	0,0028	0,0213
74 - 95	<0,0001	<0,0001	<0,0001
74 - 101	<0,0001	<0,0001	<0,0001
95 - 101	0,1508	0,0108	0,1477

Tabla 43. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos cepas clínicas para cada superficie. Aparecen marcadas en gris los valores de $p < 0,05$ para el test de Wilcoxon Mann-Whitney, indica que las diferencias fueron estadísticamente significativas.

3. ADHERENCIA BACTERIANA PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS SIN PLATA

3.1. Adherencia bacteriana de cepas de colección para los materiales modificados sin plata

Cuando comparamos los diferentes recubrimientos sin plata, Cu-Mn-O es el que presentó de manera estadísticamente significativa una menor adherencia bacteriana, seguido por DLC, Ti-O y YSZ. Todas las diferencias fueron estadísticamente significativas.

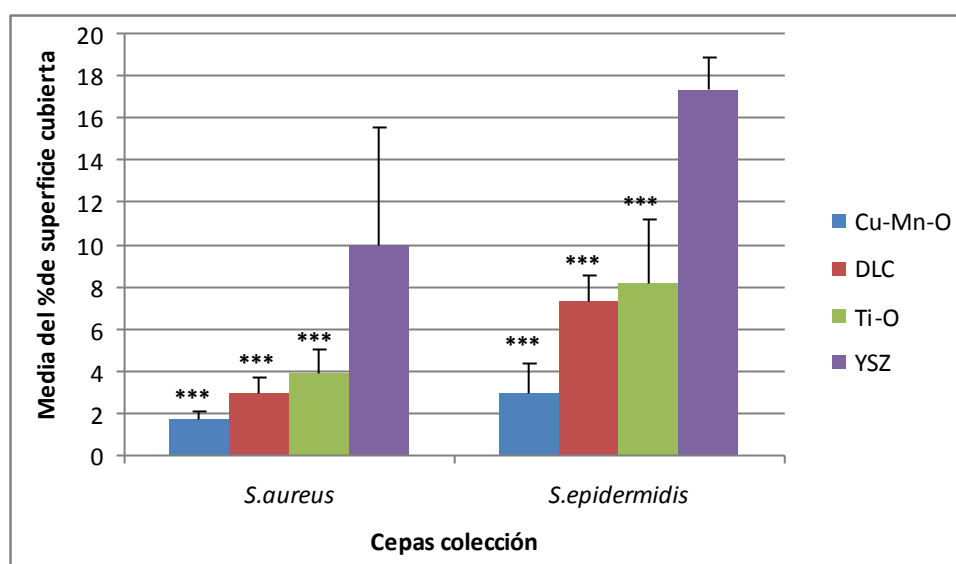


Figura 37 Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta por las cepas colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de materiales fueron estadísticamente significativas.

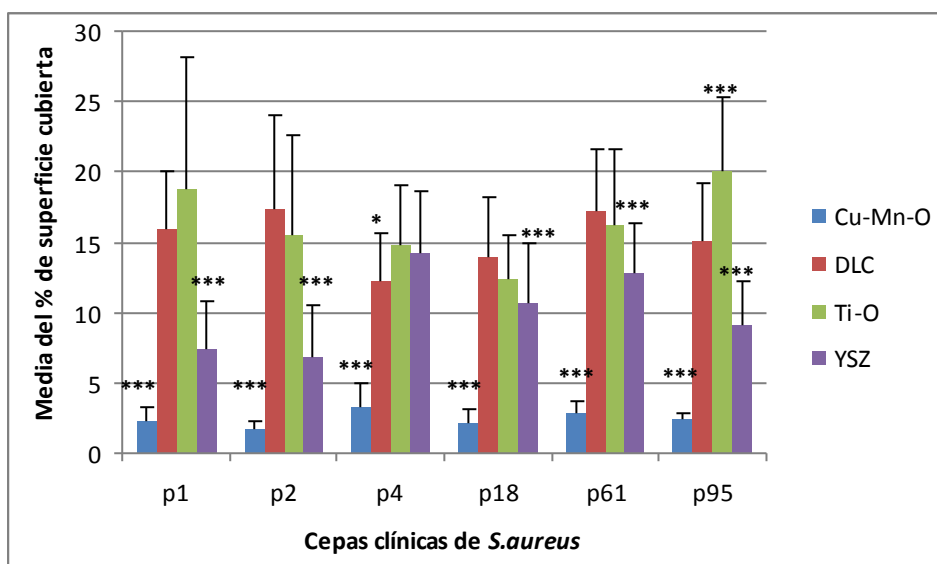
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	Valor p	Valor p
Cu-Mn-O vs DLC	<0,0001	0,0245
Cu-Mn-O vs Ti-O	<0,0001	<0,0001
Cu-Mn-O vs YSZ	<0,0001	<0,0001
DLC vs Ti-O	0,0066	<0,0001
DLC vs YSZ	0,0001	<0,0001
TiO vs YSZ	0,0012	<0,0001

Tabla 44. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa de colección.

3.2. Adherencia bacteriana de las cepas clínicas para los materiales modificados sin plata

- Cu-Mn-O presentó menor adherencia bacteriana de forma estadísticamente significativa al compararla con el resto de recubrimientos sin plata.
- En nueve de las cepas clínicas el recubrimiento con YSZ mostró menor adherencia bacteriana que el DLC y en diez, menos que el Ti-O.
- En la mitad de las cepas clínicas el DLC presentó una disminución de la adherencia estadísticamente menor que el Ti-O, en todas las demás menos una (p33), las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

a



b

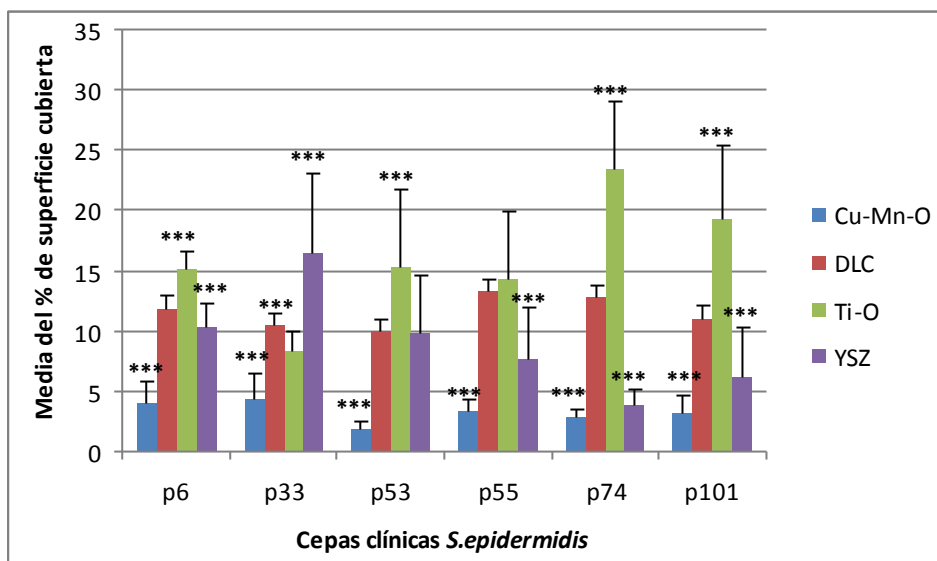


Figura 38. Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta por las cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. *Las diferencias con Ti-6Al-4V fueron estadísticamente

significativas.***Las diferencias con el resto de materiales fueron estadísticamente significativas.

	<i>S.aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Cu-Mn-O vs DLC	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Cu-Mn-O vs Ti-O	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Cu-Mn-O vs YSZ	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
DLC vs Ti-O	0,5636	0,3752	0,0328	0,2654	0,5919	0,0012
DLC vs YSZ	<0,0001	<0,0001	0,1076	0,0076	0,0012	<0,0001
TiO vs YSZ	<0,0001	<0,0001	0,5226	0,0489	0,0145	<0,0001
	<i>S.epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Cu-Mn-O vs DLC	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Cu-Mn-O vs YSZ	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Cu-Mn-O vs Ti-O	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0012
DLC vs Ti-O	0,0001	<0,0001	0,0017	0,4578	<0,0001	<0,0001
DLC vs YSZ	0,0454	0,0002	0,8934	0,0002	<0,0001	0,0001
TiO vs YSZ	<0,0001	<0,0001	0,0063	0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabla 45. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

4. PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS ADHERIDAS PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS SIN PLATA

4.1. Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas de colección para los materiales modificados sin plata

Para *S. aureus* el Cu-Mn-O presentó un porcentaje mayor que todos los demás recubrimientos sin plata de forma estadísticamente significativa. En los demás casos no hubo diferencias significativas.

Para *S. epidermidis* DLC es el que presentó mayor proporción de bacterias muertas y YSZ el que menor, de manera estadísticamente significativa.

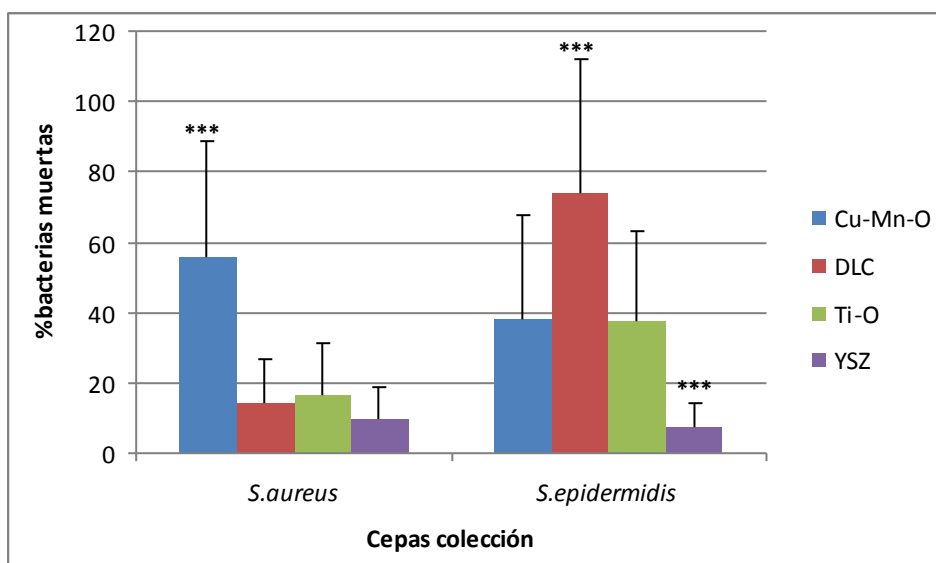


Figura 39. Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta por las cepas de colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*. ***Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas.

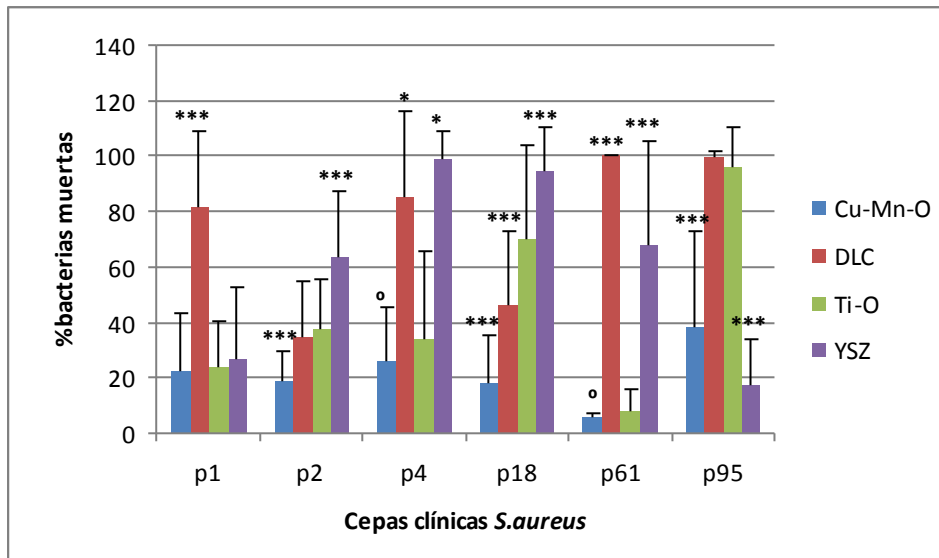
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	Valor p	Valor p
Cu-Mn-O vs DLC	<0,0001	0,0021
Cu-Mn-O vs Ti-O	<0,0001	0,8286
Cu-Mn-O vs YSZ	<0,0001	<0,0001
DLC vs Ti-O	0,8608	0,0017
DLC vs YSZ	0,2466	<0,0001
TiO vs YSZ	0,1373	<0,0001

Tabla 46. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

4.2. Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas clínicas para los materiales modificados sin plata

- Las diferencias entre las superficies de Ti-6Al-4V con Cu-Mn-O y Ti-6Al-4V con DLC fueron estadísticamente significativas para once cepas clínicas de las cuales el DLC mostró un porcentaje mayor de bacterias muertas en diez de las cepas.
- Con respecto al recubrimiento con Ti-O el Cu-Mn-O presentó diferencias estadísticamente significativas para 6 de las cepas, de las cuales en cinco de ellas Ti-O mostró un mayor porcentaje de bacterias muertas.
- Al comparar Cu-Mn-O con YSZ observamos diferencias estadísticamente significativas en diez cepas dentro de las cuales el YSZ presentaba mayor porcentaje de bacterias muertas en ocho cepas.
- Al comparar el recubrimiento con DLC y Ti-O se encontraron diferencias estadísticamente significativas en siete cepas de las cuales en seis el DLC presentaba un mayor porcentaje de bacterias muertas.
- El recubrimiento con DLC comparado con YSZ mostró diferencias estadísticamente significativas en 9 cepas de las cuales en seis el DLC presentaba un mayor porcentaje de bacterias muertas.
- Existían diferencias estadísticamente significativas en 9 cepas al comparar el recubrimiento con Ti-O y YSZ de las cuales en seis el YSZ tenía un mayor porcentaje de bacterias muertas.

a



b

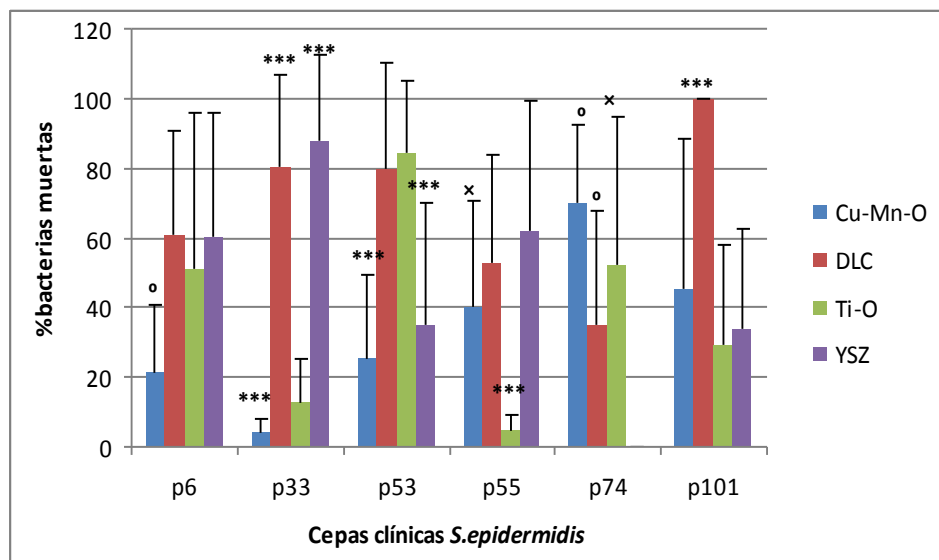


Figura 40 Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*. *Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a Ti-O ** Las diferencias con DLC fueron estadísticamente significativas *** Las diferencias con el resto de superficies fueron estadísticamente significativas ° Las diferencias con todos los materiales excepto Ti-O fueron estadísticamente significativas × Las diferencias con YSZ fueron estadísticamente significativas

	<i>S. aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Cu-Mn-O vs DLC	<0,0001	0,0020	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
Cu-Mn-O vs Ti-O	0,6044	0,0003	0,5747	<0,0001	0,3881	<0,0001
Cu-Mn-O vs YSZ	0,8594	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0146
DLC vs Ti-O	<0,0001	0,5567	<0,0001	0,0134	<0,0001	0,9115
DLC vs YSZ	<0,0001	0,0001	0,1196	<0,0001	0,0001	<0,0001
TiO vs YSZ	0,7954	0,0004	0,0000	0,0208	<0,0001	<0,0001
	<i>S.epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Cu-Mn-O vs DLC	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1454	0,0004	<0,0001
Cu-Mn-O vs Ti-O	0,0829	0,0060	<0,0001	<0,0001	0,2794	0,3390
Cu-Mn-O vs YSZ	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,0363	<0,0001	0,9153
DLC vs Ti-O	0,6634	<0,0001	0,8646	<0,0001	0,3038	<0,0001
DLC vs YSZ	0,9505	0,0354	0,0001	0,3663	<0,0001	<0,0001
TiO vs YSZ	0,3587	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5563

Tabla 47. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

5. ADHERENCIA BACTERIANA PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS CON PLATA

5.1. Adherencia bacteriana de las cepas de colección para los materiales modificados con plata

- Para *S. aureus* el recubrimiento con plata que presentó una menor adherencia bacteriana de forma estadísticamente significativa es el que incorpora TiO-highAg.

El recubrimiento con plata que presentó una mayor adherencia bacteriana de forma estadísticamente significativa es el que incorpora plata implantada iónicamente en la dosis más baja.

Cuando comparamos Ti-6Al-4V con Ag-Cu-Mn-O y el resto de modificaciones con plata, únicamente no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a la modificación con plata implantada en la dosis más alta y a la de YSZ-Ag. Este último no presentó diferencias estadísticas además con respecto a los recubrimientos con plata implantada en sus dosis más altas.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre el recubrimiento con DLC-Ag y los de TiO-lowAg y plata implantada en una dosis de 5×10^{16} .

- Para *S. epidermidis* el recubrimiento que presentó menor adherencia bacteriana es el que incorpora plata implantada en una dosis más alta, esta diferencia es estadísticamente significativa con todas las modificaciones con plata excepto la que incorpora plata implantada en una dosis de 5×10^{16} Ag. Esta última a su vez no mostró diferencias estadísticamente significativas con TiO-high Ag.

El recubrimiento con DLC-Ag y el que incorpora YSZ-Ag son los que mayor adherencia presentaron de forma estadísticamente significativa. No existieron diferencias estadísticas entre ellos.

No existieron diferencias estadísticas entre Ag-Cu-Mn-O y TiO-high Ag ni entre Ag-Cu-Mn-O y el material que incorpora plata implantada en dosis más baja.

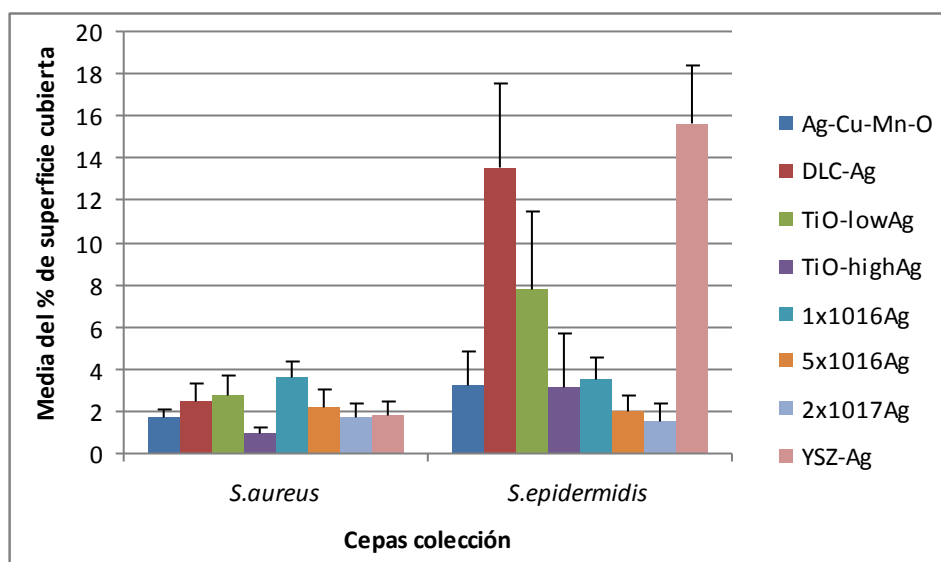


Figura 41 Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta por las cepas colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Ag-Cu-Mn-O vs DLC-Ag	0,0002	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-lowAg	<0,0001	0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-highAg	<0,0001	0,4451
Ag-Cu-Mn-O vs 1x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,9096
Ag-Cu-Mn-O vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0168	0,0153
Ag-Cu-Mn-O vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,7637	0,0002
Ag-Cu-Mn-O vs YSZ-Ag	0,9339	<0,0001
DLC-Ag vs TiO-lowAg	0,3581	0,0001
DLC-Ag vs TiO-highAg	<0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,1664	<0,0001
DLC-Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0008	<0,0001
DLC-Ag vs YSZ-Ag	0,0017	0,0649
TiO-lowAg vs TiO-highAg	<0,0001	<0,0001
TiO-lowAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,0050	0,0001
TiO-lowAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0410	<0,0001
TiO-lowAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0002	<0,0001
TiO-lowAg vs YSZ-Ag	0,0003	<0,0001
TiO-highAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0288
TiO-highAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,5494
TiO-highAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	<0,0001	0,0499
TiO-highAg vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	<0,0001	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001
5x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,7560	0,0692
5x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	0,0739	<0,0001
2x10 ¹⁷ Ag vs YSZ-Ag	0,9588	<0,0001

Tabla 48. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa de colección.

5.2. Adherencia bacteriana de las cepas clínicas para los materiales modificados con plata

Para las seis cepas clínicas de *S. aureus* Ag-Cu-Mn-O presentó la menor adherencia bacteriana de forma estadísticamente significativa, en el caso de p61 no se encontraron diferencias estadísticas con 5×10^{16} Ag. Para las cepas p53 y p101 de *S. epidermidis* sigue presentando la menor adherencia bacteriana ya que no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a YSZ-Ag.

Para p6, p33 y p55 de *S. epidermidis* la modificación con plata implantada con una dosis de 5×10^{16} Ag es la q menor adherencia bacteriana presentó aunque la diferencia con respecto a la dosis más baja 1×10^{16} Ag no fue estadísticamente significativa para las tres cepas ni con respecto a 2×10^{17} para p33 y p55.

Para p74 la modificación con YSZ-Ag es la que menor adherencia presentó de forma estadísticamente significativa.

Para p1, p2, p4, p53 y p74 la modificación con plata implantada en una dosis de 1×10^{16} Ag es la que mayor adherencia bacteriana presentó. Para p53 y p74 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a 5×10^{16} Ag ni para p2 con respecto a 2×10^{17} .

Para p18, p61, p95, p6, p33, p55 y p101 la modificación que incorpora TiO-highAg es la que mayor adherencia bacteriana presentó. Aunque para p18 la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a DLC-Ag y TiO-lowAg. Para p33 no lo fue con respecto a DLC-Ag y para p101 no lo fue con respecto a TiO-lowAg

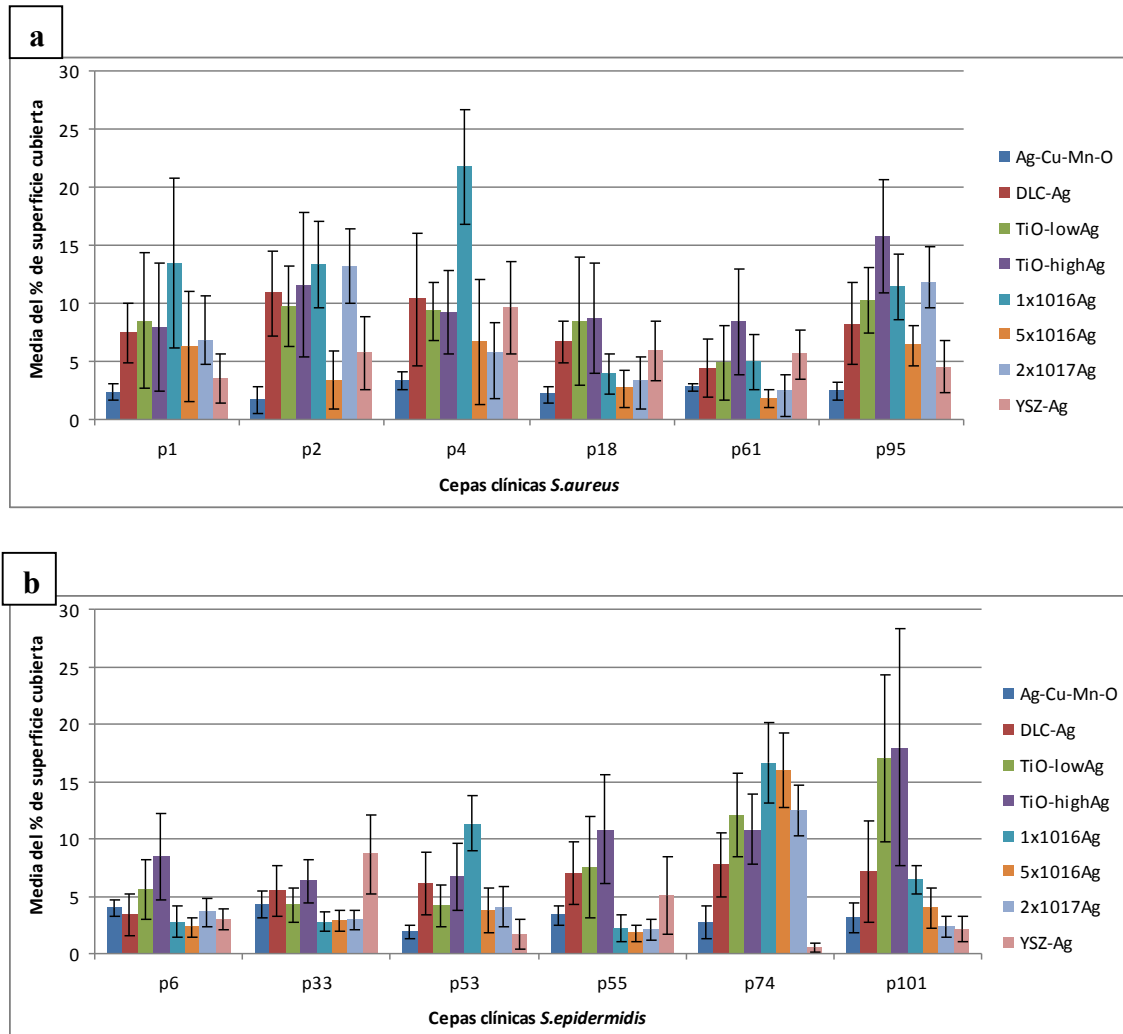


Figura 42 Porcentaje medio de la superficie de cada biomaterial cubierta por las cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*.

	<i>S.aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ag-Cu-Mn-O vs DLC-Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-lowAg	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-highAg	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs 1x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs 5x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0008	<0,0001	0,0060	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs 2x10 ¹⁷ Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs TiO-lowAg	0,9425	0,0928	0,2237	0,4093	0,7806	0,0501
DLC-Ag vs TiO-highAg	0,8528	0,6800	0,2789	0,2928	0,0004	<0,0001
DLC-Ag vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,0039	0,0105	<0,0001	<0,0001	0,2609	0,0071
DLC-Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,1146	0,0000	0,0061	<0,0001	<0,0001	0,0761
DLC-Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,2316	0,0227	0,0015	<0,0001	0,0029	0,0027
DLC-Ag vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001	0,4516	0,2121	0,0465	0,0006
TiO-lowAg vs TiO-highAg	0,7966	0,3533	0,8447	0,8045	0,0015	0,0001
TiO-lowAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,0193	0,0003	<0,0001	0,0009	0,1938	0,3023
TiO-lowAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,1767	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TiO-lowAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,5776	0,0009	<0,0001	0,0003	0,0078	0,1458
TiO-lowAg vs YSZ-Ag	0,0012	0,0001	0,5293	0,1488	0,1219	<0,0001
TiO-highAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,0099	0,0167	<0,0001	<0,0001	0,0016	0,0019
TiO-highAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,2789	<0,0001	0,0025	0,0000	<0,0001	<0,0001
TiO-highAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,8045	0,0203	0,0004	0,0000	0,0000	0,0035
TiO-highAg vs YSZ-Ag	0,0010	0,0001	0,5847	0,0454	0,0246	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0004	<0,0001	<0,0001	0,0118	<0,0001	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0005	0,6649	<0,0001	0,1973	<0,0001	0,6647
1x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0091	0,1936	<0,0001
5x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,2928	<0,0001	0,3751	0,1668	0,2193	<0,0001
5x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	0,0577	0,0041	0,0011	<0,0001	<0,0001	0,0022
2x10 ¹⁷ Ag vs YSZ-Ag	0,0008	<0,0001	0,0003	0,0006	<0,0001	<0,0001

	<i>S.epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ag-Cu-Mn-O vs DLC-Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0.0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-lowAg	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-highAg	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs 1x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,0023	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs 5x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0007	<0,0001	0,0068	<0,0001	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs 2x10 ¹⁷ Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0014	<0,0001	0.0511
Ag-Cu-Mn-O vs YSZ-Ag	0,0663	<0,0001	0,0882	<0,0001	<0,0001	0.0674
DLC-Ag vs TiO-lowAg	0,0017	0,0363	0,0126	0,8285	0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs TiO-highAg	<0,0001	0,2566	0,4153	0,0030	0,0012	0.0012
DLC-Ag vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,2395	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0.4515
DLC-Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0264	<0,0001	0,0059	<0,0001	<0,0001	0.0137
DLC-Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,2696	0,0001	0,0061	<0,0001	<0,0001	0.0003
DLC-Ag vs YSZ-Ag	0,8124	0,0030	<0,0001	0,0091	<0,0001	0.0002
TiO-lowAg vs TiO-highAg	0,0065	0,0003	0,0011	0,0145	0,1547	0.5498
TiO-lowAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001
TiO-lowAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0007	0,3426	<0,0001	0,0008	<0,0001
TiO-lowAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0073	0,0012	0,9097	<0,0001	0,9097	<0,0001
TiO-lowAg vs YSZ-Ag	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0259	0,0000	<0,0001
TiO-highAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0.0022
TiO-highAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TiO-highAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	<0,0001	<0,0001	0,0017	<0,0001	0,0372	<0,0001
TiO-highAg vs YSZ-Ag	<0,0001	0,0268	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,3424	0,6950	<0,0001	0,4632	0,4893	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0279	0,5425	<0,0001	0,8932	<0,0001	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	0,3477	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
5x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0003	0,7648	0,5225	0,2785	0,0003	0.0013
5x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	0,0087	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	0.0006
2x10 ¹⁷ Ag vs YSZ-Ag	0,0431	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0.6343

Tabla 49. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

6. PORCENTAJE DE BACTERIAS MUERTAS ADHERIDAS PARA LOS MATERIALES MODIFICADOS CON PLATA

6.1. Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas de colección para los materiales modificados con plata

Para ambas cepas el material modificado con plata implantada iónicamente en una dosis de $2 \times 10^{17} \text{Ag}$ es la modificación con plata que mayor porcentaje de bacterias muertas presentó. Aunque para *S. aureus* la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a DLC-Ag y $5 \times 10^{16} \text{Ag}$.

Para *S. epidermidis* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre Ag-Cu-Mn-O, TiO-highAg y el resto de modificaciones con plata implantada.

Para *S. aureus* la modificación con plata que menor porcentaje de bacterias muertas presentó fue TiO-highAg aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a TiO-lowAg.

Para *S. epidermidis* el recubrimiento con plata que produjo una menor proporción de bacterias muertas adheridas es DLC-Ag aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a YSZ-Ag

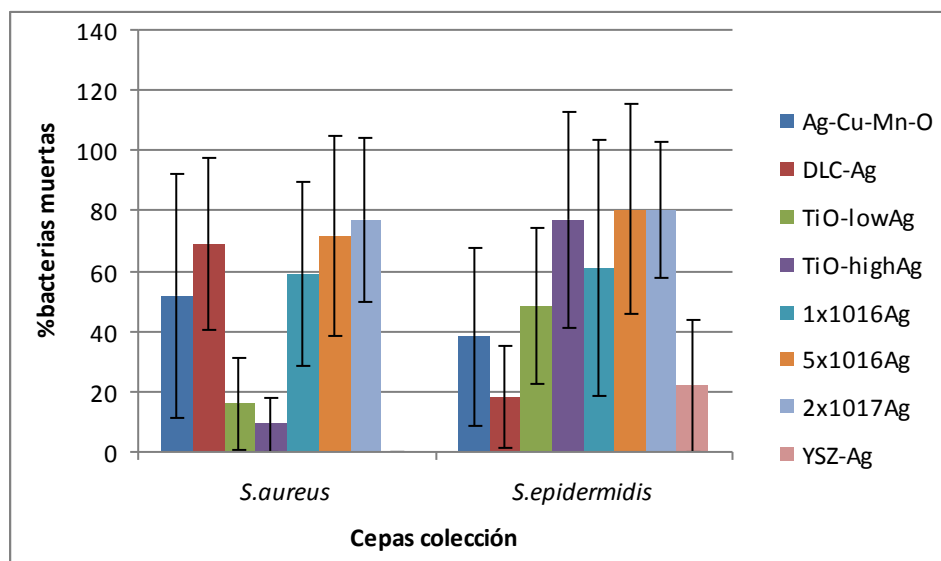


Figura 43. Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta por las cepas de colección de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
Ag-Cu-Mn-O vs DLC-Ag	0,2052	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-lowAg	0,0017	0,0020
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-highAg	<0,0001	0,3029
Ag-Cu-Mn-O vs 1×10^{16} Ag	0,3199	0,5758
Ag-Cu-Mn-O vs 5×10^{16} Ag	0,0721	0,0855
Ag-Cu-Mn-O vs 2×10^{17} Ag	0,0161	0,2416
Ag-Cu-Mn-O vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs TiO-lowAg	<0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs TiO-highAg	<0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs 1×10^{16} Ag	0,2845	0,0081
DLC-Ag vs 5×10^{16} Ag	0,4520	<0,0001
DLC-Ag vs 2×10^{17} Ag	0,2503	<0,0001
DLC-Ag vs YSZ-Ag	<0,0001	0,7028
TiO-lowAg vs TiO-highAg	0,1869	0,0039
TiO-lowAg vs 1×10^{16} Ag	<0,0001	0,2016
TiO-lowAg vs 5×10^{16} Ag	<0,0001	0,0014
TiO-lowAg vs 2×10^{17} Ag	<0,0001	0,0001
TiO-lowAg vs YSZ-Ag	<0,0001	0,0001
TiO-highAg vs 1×10^{16} Ag	<0,0001	0,0920
TiO-highAg vs 5×10^{16} Ag	<0,0001	0,3316
TiO-highAg vs 2×10^{17} Ag	<0,0001	0,7470
TiO-highAg vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001
1×10^{16} Ag vs 5×10^{16} Ag	0,2075	0,0174
1×10^{16} Ag vs 2×10^{17} Ag	0,0341	0,2061
1×10^{16} Ag vs YSZ-Ag	<0,0001	0,0170
5×10^{16} Ag vs 2×10^{17} Ag	0,5555	0,2775
5×10^{16} Ag vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001
2×10^{17} Ag vs YSZ-Ag	<0,0001	<0,0001

Tabla 50. Valor de *p* del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa de colección.

6.2. Porcentaje de bacterias muertas adheridas de cepas clínicas para los materiales modificados con plata

Podemos decir que el recubrimiento con DLC-Ag fue el que presentó una mayor proporción de bacterias muertas para la mayor parte de las cepas clínicas de manera estadísticamente significativa.

Para p6, p53 y p74, 5×10^{16} Ag y la modificación YSZ-Ag fueron los que mayor proporción de bacterias muertas adheridas mostraron, pero las diferencias en estas tres cepas con respecto a DLC-Ag no fueron estadísticamente significativas.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre DLC-Ag y 2×10^{17} Ag para p2, p4, p95, p53. No se encontraron diferencias entre DLC-Ag y YSZ-Ag para p4, p61 y p53.

1×10^{16} Ag fue la que menor proporción de bacterias muertas adheridas presentó para p1, p18, p61, p6 y TiO-lowAg para p4, p95, p55, p101. Para p1 no existieron diferencias estadísticamente significativas entre Ag-Cu-Mn-O, TiO-lowAg y 1×10^{16} Ag.

Para p4 no existieron diferencias estadísticamente significativas entre TiO-lowAg y TiO-highAg. Para p18 y p95 no existen diferencias entre 1×10^{16} Ag y TiO-lowAg.

Para p6 solo existieron diferencias estadísticamente significativas entre YSZ-Ag con respecto a TiO-lowAg y 1×10^{16} Ag.

Para p53 Ag-Cu-Mn-O fue la modificación que mostró menor proporción de bacterias muertas pero no presentó diferencias estadísticas con respecto a la combinación de Ti-O y plata.

Para p55 TiO-lowAg fue el que presentó menor proporción de bacterias muertas pero no se encontraron diferencias estadísticas con respecto a TiO-highAg.

Para p74, Ag-Cu-Mn-O fue la modificación que presentó menor proporción de bacterias muertas pero no se encontraron diferencias estadísticas con respecto a TiO-lowAg y TiO-highAg.

Para p101 TiO-lowAg fue la modificación que presentó menor proporción de bacterias muertas pero no se encontraron diferencias estadísticas con respecto a Ag-Cu-Mn-O, TiO-highAg, 5×10^{16} Ag y YSZ-Ag.

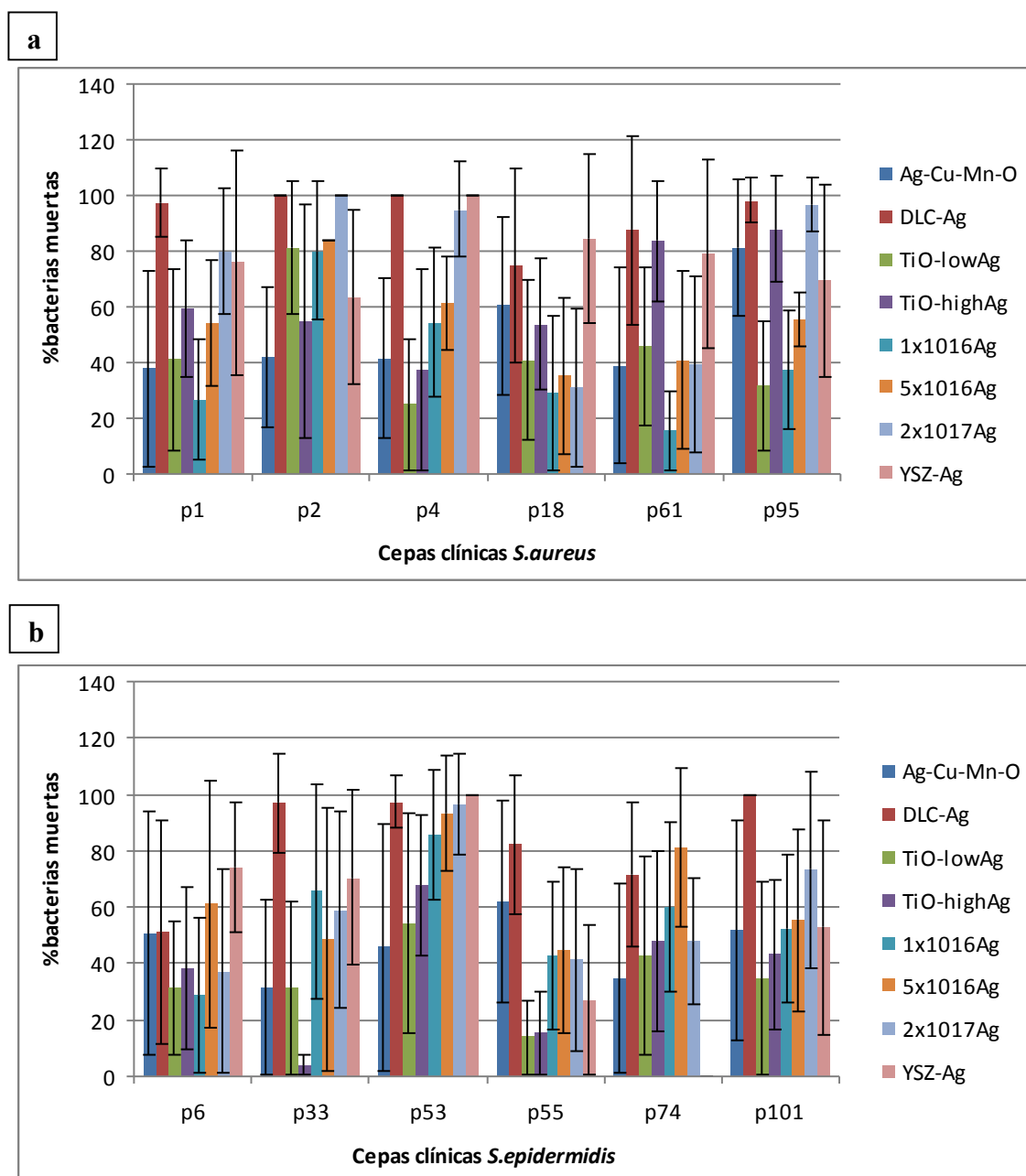


Figura 44 Porcentaje medio de bacterias muertas para cada superficie cubierta con cepas clínicas de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*.

	<i>S.aureus</i>					
	p1	p2	p4	p18	p61	p95
Ag-Cu-Mn-O vs DLC-Ag	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0823	0,0002	0,0013
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-lowAg	0,6942	0,0001	0,0309	0,0256	0,2383	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-highAg	0,0135	0,4567	0,2605	0,4450	0,0001	0,4202
Ag-Cu-Mn-O vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,5699	<0,0001	0,0533	0,0018	0,0067	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0524	0,0001	0,0076	0,0093	0,3577	0,0054
Ag-Cu-Mn-O vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0011	0,7331	0,0088
Ag-Cu-Mn-O vs YSZ-Ag	0,0001	0,0234	<0,0001	0,0096	0,0020	0,2850
DLC-Ag vs TiO-lowAg	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0015	0,0000	0,0000
DLC-Ag vs TiO-highAg	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0042	0,0425	0,0063
DLC-Ag vs 1x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0005	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001
DLC-Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0008		0,1617	0,0002	<0,0001	0,3225
DLC-Ag vs YSZ-Ag	0,0034	<0,0001		0,1807	0,1834	0,0002
TiO-lowAg vs TiO-highAg	0,0301	0,0315	0,4138	0,0525	0,0001	<0,0001
TiO-lowAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,1363	0,7877	0,0001	0,1339	<0,0001	0,2567
TiO-lowAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,2422	0,2604	<0,0001	0,3976	0,5359	0,0064
TiO-lowAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1053	0,4831	<0,0001
TiO-lowAg vs YSZ-Ag	0,0022	0,0581	<0,0001	0,0001	0,0015	0,0005
TiO-highAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	<0,0001	0,0177	0,1051	0,0024	<0,0001	<0,0001
TiO-highAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,2854	0,0042	0,0161	0,0209	<0,0001	0,0005
TiO-highAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0039	<0,0001	<0,0001	0,0018	<0,0001	0,0420
TiO-highAg vs YSZ-Ag	0,0594	0,4245	<0,0001	0,0002	0,7883	0,0795
1x10 ¹⁶ Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0044	0,5072	0,3573	0,4863	0,0002	0,1028
1x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,8117	0,0082	<0,0001
1x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	0,0001	0,0369	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0016
5x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0055	0,0005	<0,0001	0,8933	0,6875	<0,0001
5x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	0,0775	0,0126	<0,0001	0,1878	0,0004	0,1963
2x10 ¹⁷ Ag vs YSZ-Ag	0,9742	<0,0001	0,1617	0,7759	0,0001	0,0012

	<i>S.epidermidis</i>					
	p6	p33	p53	p55	p74	p101
Ag-Cu-Mn-O vs DLC-Ag	0,6240	<0,0001	<0,0001	0,0309	0,0004	<0,0001
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-lowAg	0,3410	0,3933	0,7384	<0,0001	0,4680	0,1036
Ag-Cu-Mn-O vs TiO-highAg	0,2787	0,0072	0,1297	<0,0001	0,0721	0,5770
Ag-Cu-Mn-O vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,2362	0,0038	0,0017	0,0668	0,0057	0,8851
Ag-Cu-Mn-O vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,1226	0,5160	0,0001	0,1084	<0,0001	0,8602
Ag-Cu-Mn-O vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,5737	0,0079	<0,0001	0,0476	0,0353	0,0283
Ag-Cu-Mn-O vs YSZ-Ag	0,1029	0,0002	<0,0001	0,0011	<0,0001	0,7387
DLC-Ag vs TiO-lowAg	0,1897	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0037	<0,0001
DLC-Ag vs TiO-highAg	0,2348	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0134	<0,0001
DLC-Ag vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,0772	0,0021	0,0463	<0,0001	0,1442	<0,0001
DLC-Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,2683	<0,0001	0,6269	<0,0001	0,0596	<0,0001
DLC-Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,2377	0,0001	0,6059	<0,0001	0,0018	0,0002
DLC-Ag vs YSZ-Ag	0,0540	0,0041	0,1617	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TiO-lowAg vs TiO-highAg	0,3750	<0,0001	0,4759	0,4952	0,6196	0,2972
TiO-lowAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,4704	0,0032	0,0024	<0,0001	0,0700	0,0390
TiO-lowAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0617	0,8843	<0,0001	0,0001	0,0002	0,0582
TiO-lowAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,9342	0,0016	<0,0001	0,0007	0,5843	0,0003
TiO-lowAg vs YSZ-Ag	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,0273	<0,0001	0,0696
TiO-highAg vs 1x10 ¹⁶ Ag	0,2227	<0,0001	0,0050	<0,0001	0,1436	0,3642
TiO-highAg vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0546	0,1505	<0,0001	<0,0001	0,0007	0,1456
TiO-highAg vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,7408	<0,0001	<0,0001	0,0005	0,5156	0,0027
TiO-highAg vs YSZ-Ag	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0605	<0,0001	0,5141
1x10 ¹⁶ Ag vs 5x10 ¹⁶ Ag	0,0257	0,1057	0,1366	0,9589	0,0114	0,5158
1x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,6420	0,5094	0,0260	0,6132	0,1512	0,0079
1x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	<0,0001	0,6517	0,0055	0,0133	<0,0001	0,9423
5x10 ¹⁶ Ag vs 2x10 ¹⁷ Ag	0,0590	0,2221	0,3440	0,6132	0,0001	0,0418
5x10 ¹⁶ Ag vs YSZ-Ag	0,7159	0,0513	0,0811	0,0182	<0,0001	0,7789
2x10 ¹⁷ Ag vs YSZ-Ag	0,0005	0,1964	0,3379	0,0679	<0,0001	0,0687

Tabla 51. Valor de p del test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar dos superficies para cada cepa clínica.

7. ANÁLISIS DE LIBERACIÓN DE PLATA

Hemos medido la plata que se libera de las tres primeras modificaciones con plata al someter a estos materiales a una inmersión en PBS durante 24 horas. La técnica empleada fue Espectroscopía de Emisión Atómica por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP). Los resultados para estas modificaciones aparecen en la tabla 52 donde podemos ver que el material modificado con islas de plata fue el que mayor cantidad de plata liberó al medio, seguido por el DLC-Ag.

Muestras	Ag(mg/l)	Cu(mg/l)	Mn(mg/l)
Ag-Cu-Mn-O	0,13	0,06	0,9
DLC-Ag	0,029		
TiO-lowAg	<0,01		
TiO-highAg	<0,01		

Tabla 52. Cantidad en mg/l recuperada de cada uno de los siguientes metales tras sumergir Ag-Cu-Mn-O, TiO-lowAg, TiO-highAg y DLC-Ag en PBS durante 24 horas y someterlos finalmente a una digestión con HNO₃:

DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue analizar como diferentes modificaciones que incorporan plata de un material normalmente utilizado en prótesis ortopédicas, como es el Ti-6Al-4V, pueden reducir la adhesión bacteriana. Por otro lado también se ha investigado la capacidad bactericida de dichas modificaciones sobre las bacterias durante su fase de adherencia.

Con este objetivo, hemos valorado la adherencia bacteriana empleando las dos bacterias clínicamente más relevantes en este tipo de infecciones. *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, son organismos de diferente virulencia, y la mayoría de las veces son los responsables de la mayor parte de infecciones perioperatorias relacionadas con distintos tipos de implantes. Estas bacterias, además, han sido descritas entre las más importantes colonizadoras de la piel humana. Por ello, han sido reconocidos como importantes patógenos oportunistas⁽¹³⁰⁻¹³¹⁾.

Aunque hasta ahora el uso más ampliamente documentado para la plata es como tratamiento profiláctico de las quemaduras (el gold Standard es sulfadiazina de plata) y la desinfección del agua^(22, 132), su incorporación a diversos materiales ha permitido disminuir las infecciones relacionadas con los mismos, así como otros efectos debidos a la colonización bacteriana de los mismos. Las AGNPS se utilizan en este sentido en una amplia gama de productos, tales como cosméticos y tejidos, entre otros^(116, 133). Por ejemplo, Lee et al. han desarrollado un procedimiento para la producción de AGNPS sobre el algodón de las telas que inhiben el crecimiento de varias bacterias sin efectos secundarios sobre la piel⁽¹³⁴⁾. Se han usado además compuestos solubles de plata en el tratamiento de enfermedades mentales, epilepsia, gastroenteritis y enfermedades infecciosas como sífilis y gonorrea⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾. La plata elemental requiere ionización para tener eficacia antimicrobiana, y tiene un amplio abanico de mecanismos de acción, incluyendo la ruptura de la pared celular bacteriana y las principales enzimas bacterianas, tales como los citocromos b y a3, y la interacción con ácidos nucleicos causada por su preferencia por la unión con los grupos nitrogenados de la guanina y otros nucleótidos inhibiendo la replicación de moléculas de ADN⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾.

Hemos estudiado varias estrategias para incorporar plata a una aleación de Ti-6Al-4V con el objetivo de mejorar sus propiedades antimicrobianas. La mayoría de estas estrategias incluyen uno o más pasos de funcionalización de la superficie⁽¹⁴¹⁾. Así, en otro tipo de materiales como vidrio y acero inoxidable, la funcionalización de la superficie del sustrato, por lo general con monocapas auto-ensambladas de moléculas orgánicas, es necesaria para una eficiente adsorción de la plata⁽⁷²⁾. Nuestro estudio incluyó diferentes metodologías de incorporación de plata, presentando todas ellas características únicas que tuvieron que ser tenidas en cuenta a lo largo de los experimentos.

1. MODIFICACIONES DE SUPERFICIE

1.1. Islas de plata

Una de las modificaciones que se pensó que podría tener mucho interés es la de Ag-Cu-Mn-O, ya que además de estar compuesta de dos metales nobles con propiedades antimicrobianas se encontró, a través de perfilometría láser tridimensional, que el recubrimiento de Ag-Cu-Mn-O tenía cerca de una cuarta parte de la superficie cubierta por las islas de plata ⁽²³⁾. Estas islas suponen un aumento global de la superficie del 0,1% debido a la morfología de las mismas. Con el objeto de cuantificar la importancia de esta modificación se determinó el índice de superficie, mediante el software Vision® analysis (Veeco), dando un resultado de 1.066⁽²³⁾, lo que supone un incremento relativamente pequeño de la superficie accesible por las bacterias.

Esta es la modificación con plata que presentó una menor adherencia bacteriana para la mayoría de las cepas. Esto concuerda con los datos obtenidos al analizar la liberación de plata en Ag-Cu-Mn-O, DLC-Ag, TiO-lowAg y TiO-highAg, donde nos encontramos que la modificación con las islas de plata es la que más plata libera. Además, en esta modificación hay que tener en cuenta la presencia del Cu, que refuerza el efecto antimicrobiano de la plata. A la hora de comparar todas las modificaciones que no incorporan plata, Cu-Mn-O es la que presenta una menor adherencia bacteriana tanto para las cepas colección como para las cepas clínicas. Esto es debido a la presencia del cobre, ya que los metales nobles presentan en general buenas propiedades antimicrobianas⁽³⁵⁾.

En lo que se refiere al efecto bactericida, para las cepas colección hemos encontrado que, en el caso de *S.aureus*, Cu-Mn-O produce un aumento estadístico de este porcentaje con respecto a Ti-6Al-4V, pero la incorporación de plata solo da lugar a un mayor efecto bactericida con respecto a la aleación de Ti y a la modificación sin plata en el caso de la cepa colección de *S.epidermidis*. Por otra parte, al analizar las cepas clínicas Ag-Cu-Mn-O y Cu-Mn-O no presentan un efecto bactericida al compararlos con Ti-6Al-4V.

En nuestra experiencia hemos detectado emisión de fluorescencia por parte de las islas de plata, y todos los cálculos han sido realizados teniendo en cuenta este hecho⁽²³⁾. La figura 45 muestra un ejemplo de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia a una muestra que contiene islas de plata para *S. aureus* y *S. epidermidis*, respectivamente. Allí se ve cómo las bacterias adheridas presentan una coloración diferente cuando se encuentran sobre las islas de plata. Esto podría deberse a que se trata de las bacterias muertas, que aparecen teñidas de rojo-naranja, ya que parecen describir la morfología de pequeños agregados de plata dentro de las islas.

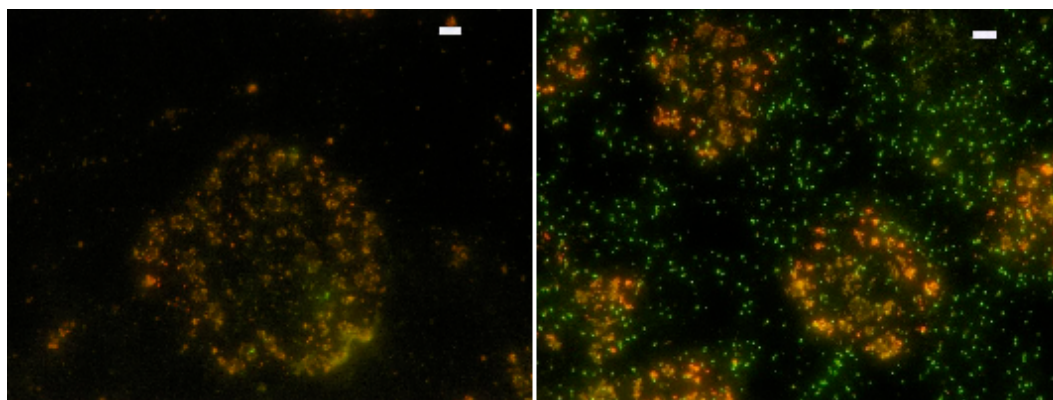


Figura 45. Imágenes tomadas con microscopía de fluorescencia de colonias de a) *S. aureus* y b) *S. epidermidis*, adheridas a Ti-6Al-4V cubierto con Ag-Cu-Mn-O recocido. La barra blanca representa 10 μm de longitud.

1.2. DLC con plata

Uno de los posibles enfoques para minimizar el desgaste en la superficie de aleaciones de titanio es la protección de la superficie de la aleación por medio de recubrimientos biocompatibles de DLC. Las películas de DLC son un material biomédico atractivo debido a su alta dureza, bajo coeficiente de fricción, buena estabilidad química y una excelente hemocompatibilidad^(129, 142-144). En la figura 46 se puede ver, de hecho, como disminuye claramente el desgaste cuando se realizaron los estudios de rozamiento con el Ti-6Al-4V recubierto por DLC. Dadas estas propiedades, nos planteamos la posibilidad de poder combinar la resistencia al desgaste y corrosión del DLC con las propiedades antimicrobianas de la plata mediante la incorporación de la misma al recubrimiento de DLC.

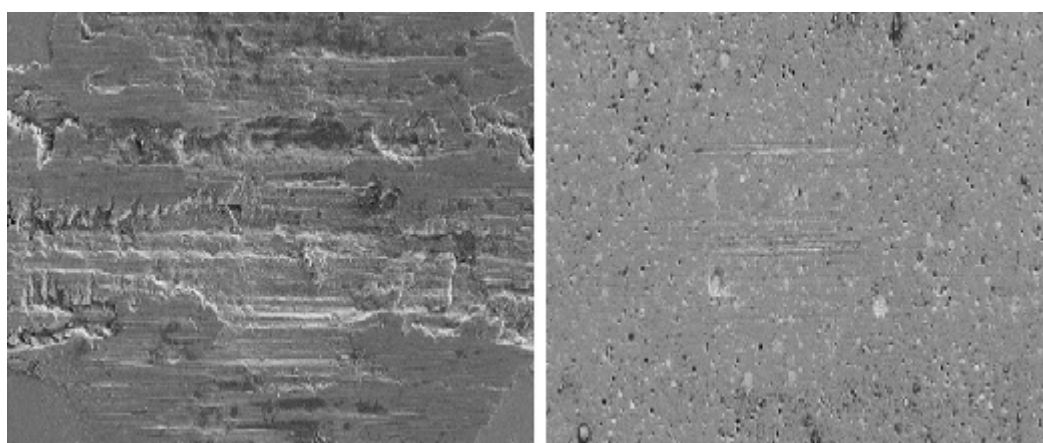


Figura 46. Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de barrido en las que vemos las marcas de desgaste por rozamiento de a) y b) Ti-6Al-V recubierto con DLC⁽¹²⁹⁾. Imagen cedida por la Unidad de Tribología de IK4 TEKNIKER, Eibar, España.

En nuestra experiencia hemos encontrado que las modificaciones con recubrimiento de DLC con y sin plata dan lugar a una disminución estadísticamente significativa de la adherencia con respecto a Ti-6Al-4V. Estos resultados coinciden con trabajos como el de Del Prado et al.⁽¹⁴⁵⁾, en el que muestran propiedades antimicrobianas por parte del DLC recubriendo un

material diferente. Además la incorporación de plata produce una disminución de la adherencia bacteriana con respecto al DLC no modificado.

Con respecto al efecto bactericida, los recubrimientos con DLC con y sin plata solo producen este efecto en el caso de la cepa de colección de *S. epidermidis* cuando se compara con la superficie control de Ti-6Al-4V. Sin embargo, para las cepas clínicas las modificaciones con DLC y DLC-Ag producen un aumento en el porcentaje de bacterias muertas adheridas en la mayoría de las cepas, siempre con respecto al control de Ti-6Al-4V. Y, entre las dos modificaciones, la que incorpora plata tiene un mayor efecto bactericida.

1.3. Ti-O con plata

En el caso del Ti-O, éste es un material fotocatalítico bajo irradiación UV bien conocido^(34, 146). Esta propiedad se utiliza, de hecho, para aplicaciones de autolimpieza: Bajo la radiación UV las nanopartículas de Ti-O generan pares electrón(e-) -hueco(h+), los cuales reaccionan con el oxígeno y las moléculas de H₂O para generar radicales libres •OH, iones superóxido (O₂⁻), radicales peroxilo (•OOH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂)⁽¹⁴⁷⁾. Los hidroxilos activos, O₂⁻, •OOH, y H₂O₂ reaccionan todos ellos con moléculas biológicas tales como lípidos, proteínas, enzimas y macromoléculas de ácido nucleico, dañando las estructuras biológicas celulares a través de una serie de reacciones de oxidación. Por otra parte, el H₂O₂ puede penetrar la membrana microbiana, teniendo efecto microbicida, y descompone además los lípidos como endotoxinas. Por lo tanto, y de acuerdo con las propiedades conocidas, Ti-O exhibe actividad antimicrobiana solamente bajo radiación UV⁽¹⁴⁸⁻¹⁴⁹⁾. En este sentido, los intentos de obtener un comportamiento antibacteriano bajo luz visible por parte de Ti-O no han sido convincentes.

Los recubrimientos compuestos, consistentes en nanopartículas de metales nobles incrustadas en una matriz, podrían ser una solución para producir superficies antibacterianas con éste tipo de material sin necesidad de dicha activación UV^(34, 147, 150-153). Dichos recubrimientos producen una disminución de la energía de intervalo de banda, que amplía el rango de la respuesta fotoactiva al espectro de la luz visible⁽¹⁴⁷⁾. La plata puede actuar además como catalizador redox, que podría mejorar la capacidad global de la foto-oxidación de Ti-O, incluso en ausencia de luz^(147, 154).

Nuestros resultados muestran una gran variación, dependiendo una vez más de si trabajamos con cepas clínicas o cepas de colección. En el estudio con las cepas de colección, los materiales modificados presentan una disminución de la adherencia bacteriana con respecto a Ti-6Al-4V. Además, la incorporación de la dosis más alta de plata produce una disminución de la adherencia, cuando se compara con el resto de modificaciones con Ti-O. Este comportamiento no era el esperado, ya que, en ausencia de plata u otro metal noble, Ti-O exhibe actividad antimicrobiana solamente bajo radiación UV⁽¹⁴⁸⁻¹⁴⁹⁾.

Sin embargo, en los experimentos realizados con las cepas clínicas, nuestros resultados muestran que TiO-lowAg presenta la misma o mayor capacidad a la hora de disminuir la adherencia bacteriana que TiO-highAg. Así, coincidimos con las investigaciones de Mungkalasiri et al., en el sentido de que una menor cantidad de plata parece tener un mayor efecto catalizador⁽³⁴⁾, y contradice a Tarquinio et al. que señalan que esta combinación no presenta un efecto antibacteriano frente a *S. aureus*⁽¹⁴⁸⁾. Nuestros resultados muestran que, en ausencia de plata, Ti-O no disminuye la adherencia bacteriana.

Las investigaciones de Mungkalasiri et al. mostraron que se necesita una menor concentración de plata en combinación con Ti-O que de Cu para obtener un mayor efecto biocida⁽³⁴⁾. Hay, por ello, un gran interés en el desarrollo de recubrimientos multifuncionales de nanocompuestos, en los cuales se combinan las ventajas de las propiedades de un óxido semiconductor y las nanopartículas de plata. TiO-Ag combina las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de Ag con la biocompatibilidad y actividad fotocatalítica de la matriz de Ti-O. Por otra parte, incorporando la plata en pequeñas cantidades se pueden mejorar además las propiedades fotocatalíticas de Ti-O^(34, 155-156).

El alto coste y miedo a una posible toxicidad de la plata pueden suponer además un importante obstáculo para la aplicación de plata como parte del recubrimiento antimicrobiano de grandes superficies. En este sentido, hay que destacar que las nanopartículas de Ti-O no han mostrado efectos tóxicos después de su ingesta en animales^(146, 157). Teniendo en cuenta esto, es deseable combinar las ventajas de Ag con Ti-O, reduciendo al mínimo el contenido de plata, pero manteniendo una alta eficacia anti-bacteriana de las superficies sin activación con luz UV y, además, con una buena durabilidad^(34, 158). El Ti-O dopado con diferentes concentraciones de plata libera una cantidad de plata muy baja. De hecho, no hemos podido encontrar diferencias entre la cantidad de plata que liberan las dos modificaciones de Ti-O. Esta combinación muestra una disminución de la adherencia bacteriana con respecto a Ti-6Al-4V, pero es uno de los recubrimientos con plata que produce mayor adherencia bacteriana en comparación con el resto de recubrimientos estudiados, y tiene además un menor efecto bactericida, a pesar de que gracias al efecto catalizador de la plata el Ti-O mantiene las propiedades antimicrobianas.

En relación con este aspecto, la incorporación de plata a Ti-O, consigue un aumento en el porcentaje de bacterias muertas en los estudios realizados con las cepas colección con respecto a la aleación sin modificar. Sin embargo, sí que es necesaria la incorporación de una concentración mayor de plata al Ti-O para que se obtenga un aumento significativo de la capacidad bactericida en el caso de *S. epidermidis*.

Sin embargo, cuando analizamos las cepas clínicas, las modificaciones con TiO no producen un aumento de este porcentaje en el caso de la mayoría de las cepas. La incorporación de plata sí que produce un aumento con respecto al material modificado, pero curiosamente no con respecto al control de Ti-6Al-4V. De hecho, en la mayoría de las cepas clínicas no existen

diferencias estadísticas entre las dos modificaciones de plata del Ti-O, y en las que existen diferencias el comportamiento es variable e impredecible.

1.4. Plata implantada iónicamente

Otra modificación del Ti-6Al-4V que hemos considerado novedosa con respecto a lo publicado hasta ahora, y que podría ayudar a mantener una concentración constante de plata a largo plazo es la implantación iónica⁽¹⁵⁹⁾. Partiendo de una misma energía de ionización, que es la que decide el grado de penetración de la plata en la aleación, hemos introducido diferentes concentraciones de plata en el material con el fin de evaluar si hay una concentración a partir de la cual el efecto antibacteriano se mantiene constante. Trabajamos con estas dosis de plata basándonos en la experiencia de otros grupos de investigación como Fiedler et al ⁽¹⁵⁹⁾.

Según Zheng et al., una superficie nanoestructurada con nanopartículas de plata implantadas podría presentar buenas propiedades antimicrobianas y, simultáneamente, no perjudicar a las células de los diversos tejidos (tales como osteoblastos)⁽¹⁶⁰⁾. La hipótesis plantea que solo los microorganismos que entren en contacto directamente con la superficie serían afectados por la plata implantada iónicamente. De esta forma, no se acumularían iones de plata en los tejidos que rodean las prótesis, con lo cual se minimizan las posibilidades de que haya algún efecto citotóxico⁽¹⁶⁰⁾.

Nuestros resultados muestran que la implantación iónica de plata muestra una menor adherencia bacteriana y un mayor efecto bactericida tanto para las cepas de colección como para las cepas clínicas. Un dato novedoso es que una implantación iónica de plata por encima de 5×10^{16} ion/cm² no supone una mayor disminución de la adherencia bacteriana, o un mayor efecto bactericida, tanto en el caso de las cepas colección como para las cepas clínicas, por lo que para su uso como antimicrobiano no sería necesaria una elevada cantidad de plata. Sin embargo, para valorar el efecto bactericida real sería necesario estudiar más cepas, ya que en muchas de las analizadas no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas. La explicación a este hecho, pensamos que puede ser encontrada en el trabajo de Zheng et al. ⁽¹⁶⁰⁾. Dados nuestros resultados y su hipótesis, pensamos que en la superficie del material hay un número limitado de iones de plata y que, mientras este número se mantenga estable mediante la llegada a la superficie desde el interior del material de nuevos iones, no hay necesidad de implantar más plata para mantener el efecto antibacteriano.

1.5. YSZ con plata

Debido a que los implantes de YSZ son bioinertes y tienen una excelente resistencia al desgaste y a la corrosión, además de poseer una alta resistencia a la flexión y a la fractura⁽¹⁶¹⁻¹⁶⁶⁾, pensamos en este material como una

excelente alternativa a las aleaciones de Ti-6Al-4V. La zirconia estabilizada con itrio (YSZ) es una de las cerámicas más utilizadas en implantes dentales, debido a sus propiedades mecánicas y a su biocompatibilidad. En lo que se refiere a osteointegración, los resultados son, de hecho, comparables o incluso mejores que los obtenidos para el titanio⁽¹⁶⁷⁻¹⁶⁸⁾ y no tiene efecto citotóxico en los fibroblastos⁽¹⁶⁶⁾. Se trata de una cerámica basada en óxido de zirconio, en la cual su particular estructura cristalina se vuelve estable a temperatura ambiente por la adición de óxido de itrio. El ZrO_2 puro tiene una estructura cristalina tetragonal estable en temperaturas por encima de los 1273° K, pero cambia a una estructura cristalina monoclinica por debajo de dicha temperatura. El objetivo del estudio realizado sería evaluar si es posible combinar las propiedades osteointegradoras de este material con las propiedades antimicrobianas de la plata.

Los resultados encontrados en nuestro trabajo apoyan a su vez estudios previos, demostrando una reducción significativa de la adherencia bacteriana con respecto a la aleación control de Ti-6Al-4V^(145, 161, 169). La incorporación de plata produce una disminución de la adherencia respecto al material modificado y sin modificar. Las modificaciones con YSZ y YSZ-Ag también tienen un efecto bactericida con respecto a Ti-6Al-4V, pero, en la mayoría de casos, no hay diferencias entre estas dos modificaciones por lo que también convendría estudiar la adherencia bacteriana con más cepas clínicas dada la variabilidad encontrada con las mismas.

2. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO DE ADHERENCIA

Nuestros resultados muestran que, tanto para las cepas clínicas como para las cepas colección, los materiales modificados presentaron en conjunto menor adherencia bacteriana que la aleación control de Ti-6Al-4V, excepto en el caso de la modificación con Ti-O. Además, observamos que la incorporación de plata produce una disminución de la adherencia con respecto a las modificaciones sin plata. Estos resultados coinciden con los de Kose et al, quienes concluyen que el recubrimiento con plata de prótesis de titanio conduce a un aumento de la resistencia a la colonización bacteriana⁽¹⁷⁰⁾. Como ya hemos comentado, Cu-Mn-O y la modificación de este recubrimiento con islas de plata son las modificaciones que producen una mayor disminución de la adherencia bacteriana al comparar las modificaciones sin y con plata respectivamente.

En relación con la capacidad bactericida, la situación es muy variable. Para la mayoría de las cepas clínicas los recubrimientos con Cu-Mn-O y Ti-O, al igual que sus modificaciones con plata no producen un aumento significativo del efecto bactericida con respecto a la aleación de Ti-6Al-4V. Sin embargo, la incorporación de plata a estas modificaciones sí que produce un aumento de la proporción de bacterias muertas adheridas con respecto a la modificación sin

plata. En el resto de modificaciones los materiales presentaron un mayor efecto bactericida con respecto al material sin modificar. Los recubrimientos con DLC son los que presentaron mayor efecto bactericida, tanto al comparar las modificaciones sin plata, como las que la incorporan.

Para evaluar las distintas modificaciones planteadas, se analizó la adherencia bacteriana empleando inicialmente cepas de colección. Estas cepas tienen la ventaja de poseer unas características estables que facilitan la reproducibilidad de los experimentos realizados. Sin embargo, se ha determinado que estas cepas poseen una carga genética menor que las cepas clínicas, aisladas de pacientes, debido a su adaptación a los medios de cultivo artificiales. Durante ese periodo de adaptación, las bacterias perderían genes debido a la misma, siendo, probablemente, algunos de ellos genes relacionados con la virulencia del microorganismo^(23, 171-174). Con el objeto de minimizar el efecto de dicha adaptación se realizaron experimentos adicionales utilizando cepas clínicas procedentes de pacientes con infección de implantes osteoarticulares. Estos experimentos permitieron evidenciar comportamientos ligeramente diferentes entre las distintas cepas estudiadas, debido probablemente a las diferentes características de las mismas. Por esta razón pensamos que, a la hora de estudiar la adherencia bacteriana, es conveniente estudiar el mayor número de cepas posibles para poder predecir con mayor fiabilidad el efecto de estas modificaciones *in vivo*.

En general, y de acuerdo con nuestros resultados, se puede considerar que la cepa de colección de *S. epidermidis* se adhiere más que la de *S. aureus* a los materiales estudiados. Y, en el caso de las cepas clínicas, podemos decir que hay un grupo de las mismas que tienen mayor tendencia a adherirse a todos los materiales. Aquí podríamos destacar las cepa p4 de *S. aureus* y p101 de *S. epidermidis*. Para los materiales modificados, además de éstas debemos destacar el particular comportamiento de la cepa p95 de *S. aureus*.

Excepto en el caso de DLC-Ag y de la plata implantada iónicamente, la especie *S. epidermidis* es la que mayor proporción de bacterias muertas presenta. En lo que se refiere a las cepas clínicas, y aunque el comportamiento de cada cepa es, de nuevo, variable con respecto a cada material, encontramos que, por lo general, las cepas p4, p95 y p101 son las que mayor proporción de bacterias muertas presentan para los diferentes materiales. Como ya mencionamos antes, estas son las bacterias que más se adhieren también a las diferentes superficies.

3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA PLATA

Los iones de plata liberados actúan inmediatamente, como se muestra en el trabajo de Gordon et al⁽²⁴⁾, bloqueando las actividades proteicas. Esto es beneficioso para prevenir las infecciones locales. Pensamos por ello que el principal beneficio de estos recubrimientos con plata es prevenir las infecciones perioperatorias. En la mayoría de los recubrimientos que hemos estudiado el

mayor efecto sobre las bacterias que buscan adherirse al material ocurriría de inmediato, y puede que este efecto también desaparezca con relativa rapidez. Sin embargo, en el caso de la plata implantada iónicamente y la incorporación de plata a Ti-O, la modificación está diseñada para promover la eficacia antibacteriana a largo plazo del metal, aunque esto no hemos llegado a probarlo. Por esta razón sería recomendable la realización de estudios de formación de biopelícula para evaluar este efecto a largo plazo.

En el caso de la plata implantada, como ya hemos comentado, el objetivo sería la acumulación lenta de iones de plata en la superficie de la aleación desde el interior del material protésico⁽¹⁷⁵⁾. Sin embargo en el caso de Ti-O se combina tanto el efecto antibacteriano de las propias nanopartículas de plata como el efecto catalizador que ésta tiene sobre el Ti-O para que tenga capacidad oxidativa. A través de los resultados que hemos obtenido en el caso de las modificaciones con Ti-O, podemos concluir que el efecto de oxidación del Ti-O tiene mayor peso que el de las propias nanopartículas de plata, ya que TiO-lowAg tiene el mismo o mejor comportamiento antibacteriano que TiO-highAg.

Las nanopartículas de plata proporcionan Ag^0 , que se desactiva más lentamente por cloruros o materia orgánica que la forma iónica. Esta última se consume por la interacción con células diana, proteínas y complejos de aniones del fluido. En forma de nanopartículas, la plata adicional se libera, produciendo de este modo un suministro constante de plata activa⁽¹⁷⁶⁾. Las propiedades morfológicas AGNP afectan además a la actividad antimicrobiana, ya que son efectores indirectos que influyen principalmente en la liberación de Ag^+ . En consecuencia, la actividad antibacteriana se puede controlar modulando la liberación de Ag^+ , posiblemente a través de la manipulación de la disponibilidad de oxígeno, tamaño de partícula, forma, y / o el tipo de recubrimiento⁽¹⁷⁷⁻¹⁷⁹⁾. De esta manera, tanto porque se libera la plata de forma rápida desde la superficie en forma de nanopartículas, como porque se libera la plata de forma más constante y lenta desde el interior del implante o porque tiene un efecto catalizador sobre el Ti-O, se evita la neutralización de los efectos de la plata por parte de los componentes extracelulares de la membrana, que se depositan sobre la prótesis.

Debido a que el mecanismo bactericida de la plata tiene como diana los residuos de cisteína, que están presentes en todas las proteínas, la plata es eficaz contra un amplio espectro de bacterias y es poco probable que se desarrollen bacterias con resistencia a la plata^(24, 36). Este hecho podría suponer una ventaja significativa en comparación con el empleo de recubrimientos basados en antibióticos⁽¹⁸⁰⁻¹⁸⁶⁾, dado que la selección de cepas resistentes a antimicrobianos ha aparecido desde la misma introducción de los antibióticos en la práctica clínica. Su empleo en implantes podría dar lugar a una mayor selección de cepas resistentes, que inhabilitaría a dichos antimicrobianos para su uso posterior en el tratamiento de infecciones de todo tipo.

4. TOXICIDAD DE LA PLATA

Un dato esencial a la hora de evaluar distintos recubrimientos con metales es su potencial toxicidad. Existen varios factores que influyen en la capacidad de un metal para producir efectos tóxicos en el cuerpo, incluyendo la solubilidad del metal, la capacidad del metal para unirse a las distintas estructuras biológicas, y el grado en que los complejos del metal que se forman son secuestrados, metabolizados y excretados. Los estudios existentes parecen demostrar que algunas formas de la plata son más tóxicas que otras⁽¹³⁵⁾. La plata metálica parece suponer un riesgo mínimo para la salud⁽¹³⁵⁾. Los compuestos solubles de plata son más fácilmente absorbidos que la plata metálica o plata insoluble y, por lo tanto, tienen mayor potencial para producir efectos adversos en el ser humano⁽¹³⁵⁾.

La exposición al polvo con niveles relativamente altos de compuestos de plata, como el nitrato de plata o el óxido de plata, puede causar problemas respiratorios, irritación en los pulmones y la garganta así como dolor de estómago. El contacto cutáneo con los compuestos de plata parece causar reacciones alérgicas leves en algunas personas, como sarpullido, hinchazón e inflamación. Existen datos recientes en la literatura que han demostrado un acúmulo sistémico de los iones de plata en sangre y orina, así como en los tejidos locales adyacentes a implantes recubiertos con plata^(179, 187).

Sin embargo, por el momento, los efectos tóxicos de la plata, tales como el argirismo (en que se pueden teñir de gris o de gris azulado algunas partes de la piel o de los tejidos del cuerpo), la argirosis ocular, gastroenteritis o la aparición de cuadros de fiebre, no se han asociado de forma habitual con recubrimientos con plata de distintas endoprótesis⁽³⁷⁻³⁸⁾. Ni Gosheger et al. ni Hardes et al. pudieron determinar efectos secundarios toxicológicos evidentes de la plata en un experimento con animales y en un estudio prospectivo clínico, respectivamente⁽¹⁸⁷⁻¹⁸⁸⁾. Esto coincide con Jung et al., que sólo encontró una leve toxicidad de iones de plata en células humanas⁽¹⁸⁹⁾. La dosis mínima de plata citada en la literatura para causar argiria, es de aproximadamente 4–6 g. Estamos hablando de una cantidad de plata mucho más grande de lo que nuestras muestras liberan al medio⁽¹⁹⁰⁻¹⁹¹⁾.

Sin embargo, en un estudio en el que analizaron 32 megaprótesis con recubrimientos de plata entre 2004 y 2011, se encontró la argiria como una respuesta ideosincrásica en el 23 % de los pacientes, aunque no se detectó ninguna evidencia de toxicidad sistémica grave a la plata. Los autores, por ello, llegan a la conclusión de que a corto plazo no se requiere la vigilancia de los niveles de sangre de plata en estos pacientes⁽¹⁹²⁾. Por otra parte, también hay otros trabajos en los que se llega a una conclusión diferente, si bien en este caso la cantidad de plata que se emplea es mucho mayor⁽¹⁹³⁾.

Finalmente, y ante el hecho de que los recursos son cada vez más escasos, la economía es un factor a tener muy en cuenta. Es cierto que las prótesis recubiertas con plata son de un 5-7% más caras que las prótesis no recubiertas⁽¹⁸⁸⁾. Sin embargo, la disminución significativa del periodo de

hospitalización y la disminución de las cirugías de revisión deben de ser factores que deben tenerse en cuenta a la hora de considerar la relación coste/eficacia de las modificaciones que se apliquen en un futuro⁽¹⁷⁹⁾.

CONCLUSIONES

1. Tanto las cepas de colección como las cepas clínicas presentaron menor adherencia bacteriana para los materiales modificados con respecto a la aleación de Ti-6Al-4V, excepto en el caso de la modificación de Ti-O. En este último caso, una baja concentración de plata ejerce un mejor efecto catalítico y consigue una disminución en la adherencia bacteriana. La implantación iónica de plata por encima de 5×10^{16} Ag no ha supuesto diferencias significativas en la adherencia bacteriana.
2. La aleación Cu-Mn-O fue el recubrimiento sin plata que presentó una menor adherencia bacteriana, y Ti-O la que más bacterias adheridas presentó.
3. Las modificaciones con Cu-Mn-O y Ti-O no han producido un aumento del porcentaje de bacterias muertas al compararlas con la aleación de Ti-6Al-4V. DLC fue la modificación sin plata que presentó un mayor efecto bactericida y Cu-Mn-O la que menos.
4. Entre las modificaciones con plata, Ag-Cu-Mn-O y Ti-O con diferentes concentraciones de plata no presentaron un aumento del efecto bactericida con respecto a Ti-6Al-4V. Sin embargo DLC-Ag, la plata implantada iónicamente y YSZ-Ag sí presentaron dicho efecto. DLC-Ag fue la modificación que presentó mayor efecto bactericida y 1×10^{16} Ag y TiO lowAg las que menos.
5. Existió una amplia variabilidad en el comportamiento de las distintas cepas clínicas en relación con la adherencia y la capacidad bactericida de las modificaciones analizadas, lo que demuestra la necesidad de estudiar este tipo de organismos a la hora de obtener conclusiones válidas para la mayoría de los casos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO. A paradigm for human chronic osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am*. 1973 Oct;55(7):1511-5.
2. Rochford ET, Richards RG, Moriarty TF. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Dec;18(12):1162-7.
3. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. [Review]. 2004 Dec 7;8:37-57.
4. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research*. [Review]. 1998 Fall;43(3):338-48.
5. Dunne WM, Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):155-66.
6. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*. 1996 Jun;20(5):1083-91.
7. Høgt AH, Dankert J, Hulstaert CE, Feijen J. Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect Immun*. 1986 Jan;51(1):294-301.
8. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis*. 2001 Nov 1;33(9):1567-72.
9. Donlan RM. New approaches for the characterization of prosthetic joint biofilms. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Aug(437):12-9.
10. Cordero J, Munuera L, Folgueira MD. Influence of metal implants on infection. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*. 1994 Sep;76(5):717-20.
11. Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. 1987. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Oct(427):4-12.
12. Kinnari TJ, Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Sanchez-Munoz O, Sanchez-Salcedo S, Colilla M, et al. Influence of surface porosity and pH on bacterial adherence to hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Med Microbiol*. 2009 Jan;58(Pt 1):132-7.
13. Hudson MC, Ramp WK, Frankenburg KP. *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. *FEMS Microbiol Lett*. 1999 Apr 15;173(2):279-84.
14. Cordero J, Munuera L, Folgueira MD. The influence of the chemical composition and surface of the implant on infection. *Injury*. 1996;27 Suppl 3:SC34-7.
15. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*. 1987 Sep 25;237(4822):1588-95.
16. Abraham WR. Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria. *Curr Med Chem*. 2006;13(13):1509-24.
17. Puckett SD, Taylor E, Raimondo T, Webster TJ. The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(4):706-13.
18. Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med*. 2009 Aug 20;361(8):787-94.
19. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury*. 2006 May;37 Suppl 2:S3-14.

20. Barth E, Myrvik QM, Wagner W, Gristina AG. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials*. 1989 Jul;10(5):325-8.
21. Chang CC, Merritt K. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. *J Orthop Res*. 1994 Jul;12(4):526-31.
22. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*. 2007 Mar;33(2):139-48.
23. Perez-Tanoira R, Perez-Jorge C, Endrino JL, Gomez-Barrena E, Horwat D, Pierson JF, et al. Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver Islands. *Journal of biomedical materials research Part A. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2012 Jun;100(6):1521-8.
24. Gordon O, Vig Slenters T, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Oct;54(10):4208-18.
25. Taglietti A, Diaz Fernandez YA, Amato E, Cucca L, Dacarro G, Grisoli P, et al. Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria. *Langmuir*. 2012 May 29;28(21):8140-8.
26. Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Jun;33(6):587-90.
27. Holt KB, Bard AJ. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry*. 2005 Oct 4;44(39):13214-23.
28. Liu J, Hurt RH. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ Sci Technol*. 2010 Mar 15;44(6):2169-75.
29. Xiu ZM, Zhang QB, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJ. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett*. 2012 Aug 8;12(8):4271-5.
30. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, et al. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*. 2003 May;48(4):1075-87.
31. Esteban J, Gomez-Barrena E, Cordero J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R. Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Feb;46(2):488-92.
32. Esteban J, Molina-Manso D, Spiliopoulou I, Cordero-Ampuero J, Fernandez-Roblas R, Foka A, et al. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta Orthop. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2010 Dec;81(6):674-9.
33. Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of microbiological methods*. 1999 Jul;37(1):77-86.
34. Jitti Mungkalasiri LB, Fabrice Emieux, Jeanne Dore, Francois N. R. Renaud, Christos Sarantopoulos and Francis Maury*. CVD Elaboration of Nanostructured TiO₂-Ag Thin Films with Efficient Antibacterial Properties. *Chemical vapor deposition*. 2010;16:35-41.

35. Davenport K, Keeley FX. Evidence for the use of silver-alloy-coated urethral catheters. *J Hosp Infect.* 2005 Aug;60(4):298-303.
36. Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial silver. *Met Based Drugs.* 1994;1(5-6):467-82.
37. Palamar M, Guven Yilmaz S, Akalin T, Egrilmez S, Yagci A. Confocal microscopy in biopsy proven argyrosis. *Case Rep Ophthalmol Med.* 2013;2013:875989.
38. Hadrup N, Lam HR. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver - A review. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014 Feb;68(1):1-7.
39. Adachi K, Tsurumoto T, Yonekura A, Nishimura S, Kajiyama S, Hirakata Y, et al. New quantitative image analysis of staphylococcal biofilms on the surfaces of nontranslucent metallic biomaterials. *J Orthop Sci.* 2007 Mar;12(2):178-84.
40. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR, The-Hospital-Infection-Control-Practices-Advisory-Committee. Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 1999;20(4):247-78.
41. Darouiche RO. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *New England Journal of Medicine.* 2004;350:1422-9.
42. Edwards C, Counsell A, Boulton C, Moran CG. Early infection after hip fracture surgery: risk factors, costs and outcome. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Jun;90(6):770-7.
43. Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. *Orthop Clin North Am.* [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1984 Jul;15(3):517-35.
44. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *The International journal of artificial organs.* [Review]. 2005 Nov;28(11):1062-8.
45. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.
46. Engineering MSUCfB. Biofilm hypertextbook.
47. Busscher HJ, van der Mei HC. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathog.* Jan;8(1):e1002440.
48. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med.* 2004 Apr 1;350(14):1422-9.
49. Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 Aug(437):7-11.
50. Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br.* 2003 Aug;85(6):918-21.
51. Morisaki H, Nagai S, Ohshima H, Ikemoto E, Kogure K. The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology.* 1999 Oct;145 (Pt 10):2797-802.
52. Otto K, Norbeck J, Larsson T, Karlsson KA, Hermansson M. Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J Bacteriol.* 2001 Apr;183(8):2445-53.
53. Varga JJ, Nguyen V, O'Brien DK, Rodgers K, Walker RA, Melville SB. Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other *Clostridia*. *Mol Microbiol.* 2006 Nov;62(3):680-94.
54. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol.* 2003 Jun;48(6):1511-24.

55. Ueda A, Wood TK. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog.* 2009 Jun;5(6):e1000483.
56. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 1998 Oct;30(2):295-304.
57. Davies DG, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Mar;61(3):860-7.
58. Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE. Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS One.* 7(12):e51241.
59. Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in immunopathology.* 2011 Mar;34(2):201-14.
60. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.* 2006 Feb;36(2):78-91.
61. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, et al. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* Nov;6(11):1329-49.
62. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):95-108.
63. Villa J, Soriano A, Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los matyeriales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2008;26(1):48-55.
64. Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanohara H, Hashiguchi T, et al. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Oct;63(1):10-5.
65. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials.* 2007 Mar;28(9):1711-20.
66. Guggenbichler JP, Assadian O, Boeswald M, Kramer A. Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* 2011;6(1):Doc18.
67. Burger JW, Luijendijk RW, Hop WC, Halm JA, Verdaasdonk EG, Jeekel J. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia. *Ann Surg.* 2004 Oct;240(4):578-83; discussion 83-5.
68. Satishkumar R, Sankar S, Yurko Y, Lincourt A, Shipp J, Heniford BT, et al. Evaluation of the antimicrobial activity of lysostaphin-coated hernia repair meshes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Sep;55(9):4379-85.
69. Lee CH, Chung YS, Lee SH, Yang HJ, Son YJ. Analysis of the factors influencing bone graft infection after cranioplasty. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012 Jul;73(1):255-60.
70. Benzel EC, Thammavaram K, Kesterson L. The diagnosis of infections associated with acrylic cranioplasties. *Neuroradiology.* 1990;32(2):151-3.
71. Gottenbos B, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Nieuwenhuis P. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *J Mater Sci Mater Med.* 2002 Aug;13(8):717-22.

72. Flores CY, Minan AG, Grillo CA, Salvarezza RC, Vericat C, Schilardi PL. Citrate-Capped Silver Nanoparticles Showing Good Bactericidal Effect against Both Planktonic and Sessile Bacteria and a Low Cytotoxicity to Osteoblastic Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013 Apr 24;5(8):3149-59.
73. Elias CN, Oshida Y, Lima JH, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2008 Jul;1(3):234-42.
74. Kshetry VR, Hardy S, Weil RJ, Angelov L, Barnett GH. Immediate titanium cranioplasty after debridement and craniectomy for postcraniotomy surgical site infection. *Neurosurgery*. 2012 Mar;70(1 Suppl Operative):8-14; discussion -5.
75. Wiggins A, Austerberry R, Morrison D, Ho KM, Honeybul S. Cranioplasty With Custom-Made Titanium Plates-14 Years Experience. *Neurosurgery*. 2013 Feb;72(2):248-56.
76. Lee JH, Kim SW, Yoon BI, Ha US, Sohn DW, Cho YH. Factors that affect nosocomial catheter-associated urinary tract infection in intensive care units: 2-year experience at a single center. *Korean J Urol*. 2013 Jan;54(1):59-65.
77. Teichgraber JF, Spector M, Per-Lee JH, Jackson RT. Tissue response to Plasti-Pore and Proplast otologic implants in the middle ears of cats. *Am J Otol*. 1983 Oct;5(2):127-36.
78. Engelsman AF, van der Mei HC, Ploeg RJ, Busscher HJ. The phenomenon of infection with abdominal wall reconstruction. *Biomaterials*. 2007 May;28(14):2314-27.
79. Speranza G, Gottardi G, Pederzoli C, Lunelli L, Canteri R, Pasquardini L, et al. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*. [Comparative Study Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 May;25(11):2029-37.
80. Meier R, Hauser-Gerspach I, Luthy H, Meyer J. Adhesion of oral streptococci to all-ceramics dental restorative materials in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Oct;19(10):3249-53.
81. Heyse TJ, Haas SB, Efe T. The use of oxidized zirconium alloy in knee arthroplasty. *Expert Rev Med Devices*. 2012 Jul;9(4):409-21.
82. Giordano R, 2nd. Zirconia: a proven, durable ceramic for esthetic restorations. *Compend Contin Educ Dent*. 2012 Jan;33(1):46-9.
83. Nawrocki J, Rigney MP, McCormick A, Carr PW. Chemistry of zirconia and its use in chromatography. *J Chromatogr A*. 1993 Dec 31;657(2):229-82.
84. Gibbons RJ, Qureshi JV. Inhibition of adsorption of *Streptococcus mutans* strains to saliva-treated hydroxyapatite by galactose and certain amines. *Infect Immun*. 1979 Dec;26(3):1214-7.
85. Ellingsen JE. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*. 1991 Aug;12(6):593-6.
86. Yadla S, Campbell PG, Chitale R, Maltenfort MG, Jabbour P, Sharan AD. Effect of early surgery, material, and method of flap preservation on cranioplasty infections: a systematic review. *Neurosurgery*. 2011 Apr;68(4):1124-9; discussion 30.
87. Cheng YK, Weng HH, Yang JT, Lee MH, Wang TC, Chang CN. Factors affecting graft infection after cranioplasty. *J Clin Neurosci*. 2008 Oct;15(10):1115-9.
88. Tokoro K, Chiba Y, Tsubone K. Late infection after cranioplasty--review of 14 cases. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1989 Mar;29(3):196-201.
89. Gomez-Barrena E, Esteban J, Medel F, Molina-Manso D, Ortiz-Perez A, Cordero-Ampuero J, et al. Bacterial adherence to separated modular components in

- joint prosthesis: a clinical study. *J Orthop Res.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Oct;30(10):1634-9.
90. Kantorski KZ, Scotti R, Valandro LF, Bottino MA, Koga-Ito CY, Jorge AO. Adherence of *Streptococcus mutans* to uncoated and saliva-coated glass-ceramics and composites. *Gen Dent.* 2008 Nov-Dec;56(7):740-7; quiz 8-9, 68.
91. Boyd RD VJ, Jones MV, Bhakoo M. Use of Atomic Force Microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion. *Langmuir.* 2002;18:2343-6.
92. Kinnari TJ, Esteban J, Gomez-Barrena E, Zamora N, Fernandez-Roblas R, Nieto A, et al. Bacterial adherence to SiO₂-based multifunctional bioceramics. *J Biomed Mater Res A.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Apr;89(1):215-23.
93. Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Res Microbiol.* 2005 May;156(4):506-14.
94. Baillif S, Ecochard R, Hartmann D, Freney J, Kodjikian L. [Intraocular lens and cataract surgery: comparison between bacterial adhesion and risk of postoperative endophthalmitis according to intraocular lens biomaterial]. *Journal francais d'ophtalmologie.* [Comparative Study Review]. 2009 Sep;32(7):515-28.
95. Dickinson RB, Nagel JA, Proctor RA, Cooper SL. Quantitative comparison of shear-dependent *Staphylococcus aureus* adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties. *J Biomed Mater Res.* 1997 Aug;36(2):152-62.
96. Baumgartner JN, Cooper SL. Influence of thrombus components in mediating *Staphylococcus aureus* adhesion to polyurethane surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998 Jun 15;40(4):660-70.
97. Yu JL, Ljungh A, Andersson R, Jakab E, Bengmark S, Wadstrom T. Promotion of *Escherichia coli* adherence to rubber slices by adsorbed fibronectin. *J Med Microbiol.* 1994 Aug;41(2):133-8.
98. Antoci V, Jr., King SB, Jose B, Parvizi J, Zeiger AR, Wickstrom E, et al. Vancomycin covalently bonded to titanium alloy prevents bacterial colonization. *J Orthop Res.* 2007 Jul;25(7):858-66.
99. Henry SL, Ostermann PA, Seligson D. The prophylactic use of antibiotic impregnated beads in open fractures. *J Trauma.* 1990 Oct;30(10):1231-8.
100. Kollef MH, Afessa B, Anzueto A, Veremakis C, Kerr KM, Margolis BD, et al. Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial. *JAMA.* 2008 Aug 20;300(7):805-13.
101. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury.* 2006 May;37 Suppl 2:S105-12.
102. Raad I, Darouiche R, Dupuis J, Abi-Said D, Gabrielli A, Hachem R, et al. Central venous catheters coated with minocycline and rifampin for the prevention of catheter-related colonization and bloodstream infections. A randomized, double-blind trial. The Texas Medical Center Catheter Study Group. *Ann Intern Med.* 1997 Aug 15;127(4):267-74.
103. Mohamed N, Teeters MA, Patti JM, Hook M, Ross JM. Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to collagen under dynamic conditions. *Infect Immun.* 1999 Feb;67(2):589-94.
104. Kang S, Pinault M, Pfefferle LD, Elimelech M. Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. *Langmuir.* 2007 Aug 14;23(17):8670-3.

105. Pellarini F, Pantarotto D, Da Ros T, Giangaspero A, Tossi A, Prato M. A novel [60]fullerene amino acid for use in solid-phase peptide synthesis. *Org Lett*. 2001 Jun 14;3(12):1845-8.
106. Patel MB, Harikrishnan U, Valand NN, Modi NR, Menon SK. Novel Cationic Quinazolin-4(3H)-one Conjugated Fullerene Nanoparticles as Antimycobacterial and Antimicrobial Agents. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2013 Jan 29.
107. Tran N, Tran PA. Nanomaterial-based treatments for medical device-associated infections. *Chemphyschem*. 2012 Jul 16;13(10):2481-94.
108. Cakmak A, Cirpanli Y, Bilensoy E, Yorganci K, Calis S, Saribas Z, et al. Antibacterial activity of triclosan chitosan coated graft on hernia graft infection model. *Int J Pharm*. 2009 Nov 3;381(2):214-9.
109. Sarin J, Grenman R, Aitasalo K, Pulkkinen J. Bioactive glass S53P4 in mastoid obliteration surgery for chronic otitis media and cerebrospinal fluid leakage. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2012 Sep;121(9):563-9.
110. Munukka E, Lepparanta O, Korkeamaki M, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, et al. Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jan;19(1):27-32.
111. Russell AD, Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem*. 1994;31:351-70.
112. Bicanova M, Thinschmidt G. [Oligodynamic action of silver ions on micro-organisms]. *Pharmazie*. 1985 Oct;40(10):736.
113. Zimmermann W. [Water sterilization by oligodynamic silver action]. *Zentralbl Bakteriol Orig*. 1953;160(1-5):70-3.
114. Lepparanta O, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, Hupa L, Hupa M, et al. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Feb;19(2):547-51.
115. Collart D, Mehrabi S, Robinson L, Kepner B, Mintz EA. Efficacy of oligodynamic metals in the control of bacteria growth in humidifier water tanks and mist droplets. *J Water Health*. 2006 Jun;4(2):149-56.
116. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013 Feb 4;52(6):1636-53.
117. Hall RE, Bender G, Marquis RE. Inhibitory and cidal antimicrobial actions of electrically generated silver ions. *J Oral Maxillofac Surg*. 1987 Sep;45(9):779-84.
118. Maple PA, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W. Comparison of the in-vitro activities of the topical antimicrobials azelaic acid, nitrofurazone, silver sulphadiazine and mupirocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 1992 Jun;29(6):661-8.
119. de Lima R, Seabra AB, Duran N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol*. 2012 Nov;32(11):867-79.
120. Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen*. 2002 May-Jun;10(3):141-51.
121. Shi Z, Neoh KG, Zhong SP, Yung LY, Kang ET, Wang W. In vitro antibacterial and cytotoxicity assay of multilayered polyelectrolyte-functionalized stainless steel. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Mar 15;76(4):826-34.
122. Bader KF. Organ deposition of silver following silver nitrate therapy of burns. *Plast Reconstr Surg*. 1966 Jun;37(6):550-1.

123. Zhang FQ, She WJ, Fu YF. [Comparison of the cytotoxicity in vitro among six types of nano-silver base inorganic antibacterial agents]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2005 Nov;40(6):504-7.
124. Cordero-Ampuero J, Esteban J, Garcia-Cimbrelo E, Munuera L, Escobar R. Low relapse with oral antibiotics and two-stage exchange for late arthroplasty infections in 40 patients after 2-9 years. *Acta orthopaedica*. 2007 Aug;78(4):511-9.
125. Pierson JF HD. Influence of the current applied to the silver target on the structure and the properties of Ag-Cu-O films deposited by reactive cosputtering. *Appl Surf Sci*. 2007;253:7522-6.
126. M.Mattox D. *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing*. Second ed: Elsevier; 2010.
127. Tanoue HTaH. Review of cathodic arc deposition for preparing droplet-free thin films. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2007;35(4 II):992-9.
128. Pierson JF BM, Horwat D. Silver islands formed after air annealing of amorphous Ag-Cu-Mn-O sputtered films. *J Cryst Growth*. 2009;311:349-54.
129. Viteri VSd, M.G.Barandika, Gopegui URd, Bayón R, Zubizarreta C, Fernández X, et al. Characterization of Ti-C-N coatings deposited on Ti-6Al-4V for biomedical applications. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012;117:359-66.
130. Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol*. 2012 Mar;34(2):201-14.
131. Perez-Tanoira R, Isea-Pena MC, Celdran A, Garcia-Vasquez C, Esteban J. Bacterial Adherence to Different Meshes Used in Abdominal Surgery. *Surg Infect (Larchmt)*. 2013 Nov 27.
132. Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*. 2000 Mar;26(2):131-8.
133. Tuson HH, Weibel DB. Bacteria-surface interactions. *Soft matter*. 2013 May 14;9(18):4368-80.
134. Lee HY, Park HK, Lee YM, Kim K, Park SB. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chem Commun (Camb)*. 2007 Jul 28(28):2959-61.
135. Drake PL, Hazelwood KJ. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann Occup Hyg*. 2005 Oct;49(7):575-85.
136. Marshall JP, 2nd, Schneider RP. Systemic argyria secondary to topical silver nitrate. *Arch Dermatol*. 1977 Aug;113(8):1077-9.
137. Prescott RJ, Wells S. Systemic argyria. *J Clin Pathol*. 1994 Jun;47(6):556-7.
138. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. 2000 Dec 15;52(4):662-8.
139. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res*. 2008 Nov;42(18):4591-602.
140. Trop M. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma*. 2006 Oct;61(4):1024.
141. Vasilev K, Sah VR, Goreham RV, Ndi C, Short RD, Griesser HJ. Antibacterial surfaces by adsorptive binding of polyvinyl-sulphonate-stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2010 May 28;21(21):215102.
142. Marciano FR, Lima-Oliveira DA, Da-Silva NS, Diniz AV, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Antibacterial activity of DLC films containing TiO₂ nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*. 2009 Dec 1;340(1):87-92.

143. Calzado-Martin A, Saldana L, Korhonen H, Soininen A, Kinnari TJ, Gomez-Barrena E, et al. Interactions of human bone cells with diamond-like carbon polymer hybrid coatings. *Acta biomaterialia*. 2010 Aug;6(8):3325-38.
144. Kinnari TJ, Soininen A, Esteban J, Zamora N, Alakoski E, Kouri VP, et al. Adhesion of staphylococcal and Caco-2 cells on diamond-like carbon polymer hybrid coating. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008 Sep;86(3):760-8.
145. Del Prado G, Terriza A, Ortiz-Perez A, Molina-Manso D, Mahillo I, Yubero F, et al. DLC coatings for UHMWPE: relationship between bacterial adherence and surface properties. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Oct;100(10):2813-20.
146. Wong MS, Sun DS, Chang HH. Bactericidal performance of visible-light responsive titania photocatalyst with silver nanostructures. *PLoS One*. 2010;5(4):e10394.
147. Le NT, Nagata H, Aihara M, Takahashi A, Okamoto T, Shimohata T, et al. Additional effects of silver nanoparticles on bactericidal efficiency depend on calcination temperature and dip-coating speed. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Aug 15;77(16):5629-34.
148. Tarquinio KM, Kothurkar NK, Goswami DY, Sanders RC, Jr., Zaritsky AL, LeVine AM. Bactericidal effects of silver plus titanium dioxide-coated endotracheal tubes on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:177-83.
149. Cao B, Wang Y, Li N, Liu B, Zhang Y. Preparation of an orthodontic bracket coated with an nitrogen-doped TiO₂(2-x)N_y thin film and examination of its antimicrobial performance. *Dent Mater J*. 2013;32(2):311-6.
150. Hu C, Lan Y, Qu J, Hu X, Wang A. Ag/AgBr/TiO₂ visible light photocatalyst for destruction of azodyes and bacteria. *J Phys Chem B*. 2006 Mar 9;110(9):4066-72.
151. Yao Y, Ohko Y, Sekiguchi Y, Fujishima A, Kubota Y. Self-sterilization using silicone catheters coated with Ag and TiO₂ nanocomposite thin film. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 May;85(2):453-60.
152. Hu C, Guo J, Qu J, Hu X. Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO₂ under visible light irradiation. *Langmuir*. 2007 Apr 24;23(9):4982-7.
153. Matsui Y, Otomo K, Ishida S, Yanagihara K, Kawanobe Y, Kida S, et al. Effect of silver-carrying photocatalyst "Hikari-Gintech" on mycobacterial growth in vitro. *Microbiol Immunol*. 2004;48(7):489-95.
154. Zhang Q, Sun C, Zhao Y, Zhou S, Hu X, Chen P. Low Ag-doped titanium dioxide nanosheet films with outstanding antimicrobial property. *Environmental science & technology*. 2010 Nov 1;44(21):8270-5.
155. He C, Yu Y, Hu X, Larbot A. Influence of silver doping on the photocatalytic activity of titania films. *Applied Surface Science*. 2002 11/15;200(1-4):239-47.
156. Arabatzis IM, Stergiopoulos T, Bernard MC, Labou D, Neophytides SG, Falaras P. Silver-modified titanium dioxide thin films for efficient photodegradation of methyl orange. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2003 5/8;42(2):187-201.
157. Bernard BK, Osheroff MR, Hofmann A, Mennear JH. Toxicology and carcinogenesis studies of dietary titanium dioxide-coated mica in male and female Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health*. 1990;29(4):417-29.
158. Brook LA, Evans P, Foster HA, Pemble ME, Steele A, Sheel DW, et al. Highly bioactive silver and silver/titania composite films grown by chemical vapour deposition. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2007 3/5;187(1):53-63.
159. Fiedler J, Kolitsch A, Kleffner B, Henke D, Stenger S, Brenner RE. Copper and silver ion implantation of aluminium oxide-blasted titanium surfaces: proliferative

- response of osteoblasts and antibacterial effects. *The International journal of artificial organs*. 2011 Sep;34(9):882-8.
160. Zheng Y, Li J, Liu X, Sun J. Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:875-84.
 161. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol*. 2004 Feb;75(2):292-6.
 162. Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *J Biomed Mater Res*. 1999 Dec 15;47(4):481-93.
 163. Affatato S, Testoni M, Cacciari GL, Toni A. Mixed oxides prosthetic ceramic ball heads. Part 1: effect of the ZrO₂ fraction on the wear of ceramic on polyethylene joints. *Biomaterials*. 1999 May;20(10):971-5.
 164. Ichikawa Y, Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic in vivo. *J Prosthet Dent*. 1992 Aug;68(2):322-6.
 165. Ahmad I. Yttrium-partially stabilized zirconium dioxide posts: an approach to restoring coronally compromised nonvital teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998 Oct;18(5):454-65.
 166. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999 Jan;20(1):1-25.
 167. Lima EM, Koo H, Vacca Smith AM, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Aug;19(8):780-5.
 168. Kaijin Xu YL, Shaomin Liu, Aoyang Liu, Pengyun Liu, Lihong Liu, Lanjuan Li. Microorganism adhesion inhibited by silver doped Ytria-stabilized zirconia ceramics. *Ceramics International* 37. 2011;37:2109-15.
 169. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Nov-Dec;17(6):793-8.
 170. Kose N, Otuzbir A, Peksen C, Kiremitci A, Dogan A. A silver ion-doped calcium phosphate-based ceramic nanopowder-coated prosthesis increased infection resistance. *Clin Orthop Relat Res*. 2013 Aug;471(8):2532-9.
 171. Esteban J, Molina-Manso D, Gomez-Barrena E. Bacterial adherence to vitamin E UHMWPE. Considerations about in vitro studies. *J Orthop Res*. 2012 Jul;30(7):1181: author reply -2.
 172. Gomez-Barrena E, Esteban J, Molina-Manso D, Adames H, Martinez-Morlanes MJ, Terriza A, et al. Bacterial adherence on UHMWPE with vitamin E: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Jul;22(7):1701-6.
 173. Costerton JW. *The biofilm primer*. Berlin ; New York: Springer; 2007.
 174. Fux CA, Shirtliff M, Stoodley P, Costerton JW. Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? *Trends Microbiol*. 2005 Feb;13(2):58-63.
 175. Shirwaiker RA, Samberg ME, Cohen PH, Wysk RA, Monteiro-Riviere NA. Nanomaterials and synergistic low-intensity direct current (LIDC) stimulation technology for orthopedic implantable medical devices. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2013 May-Jun;5(3):191-204.
 176. Wang Z, Sun Y, Wang D, Liu H, Boughton RI. In situ fabrication of silver nanoparticle-filled hydrogen titanate nanotube layer on metallic titanium surface for bacteriostatic and biocompatible implantation. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2903-16.
 177. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007 Mar;3(1):95-101.

178. Jones SA, Bowler PG, Walker M, Parsons D. Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber dressing. *Wound Repair Regen.* 2004 May-Jun;12(3):288-94.
179. Hussmann B, Johann I, Kautner MD, Landgraeber S, Jager M, Lendemann S. Measurement of the silver ion concentration in wound fluids after implantation of silver-coated megaprotheses: correlation with the clinical outcome. *Biomed Res Int.* 2013;2013:763096.
180. Desrousseaux C, Sautou V, Descamps S, Traore O. Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *J Hosp Infect.* 2013 Oct;85(2):87-93.
181. Fernandez-Gutierrez M, Olivares E, Pascual G, Bellon JM, San Roman J. Low-density polypropylene meshes coated with resorbable and biocompatible hydrophilic polymers as controlled release agents of antibiotics. *Acta biomaterialia.* 2013 Apr;9(4):6006-18.
182. Zhang H, Sun Y, Tian A, Xue XX, Wang L, Alquhali A, et al. Improved antibacterial activity and biocompatibility on vancomycin-loaded TiO₂ nanotubes: in vivo and in vitro studies. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:4379-89.
183. Zhang Y, Khamwannah J, Kim H, Noh SY, Yang H, Jin S. Improved dye sensitized solar cell performance in larger cell size by using TiO₂ nanotubes. *Nanotechnology.* 2013 Feb 1;24(4):045401.
184. Gulati K, Aw MS, Findlay D, Losic D. Local drug delivery to the bone by drug-releasing implants: perspectives of nano-engineered titania nanotube arrays. *Ther Deliv.* 2012 Jul;3(7):857-73.
185. Gulati K, Aw MS, Losic D. Nanoengineered drug-releasing Ti wires as an alternative for local delivery of chemotherapeutics in the brain. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2069-76.
186. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop Scand.* 2001 Dec;72(6):557-71.
187. Harges J, Ahrens H, Gebert C, Streitburger A, Buerger H, Erren M, et al. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans. *Biomaterials.* 2007 Jun;28(18):2869-75.
188. Gosheger G, Harges J, Ahrens H, Streitburger A, Buerger H, Erren M, et al. Silver-coated megaendoprotheses in a rabbit model--an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials.* 2004 Nov;25(24):5547-56.
189. Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Apr;74(7):2171-8.
190. Brutel de la Riviere A, Dossche KM, Birnbaum DE, Hacker R. First clinical experience with a mechanical valve with silver coating. *J Heart Valve Dis.* 2000 Jan;9(1):123-9; discussion 9-30.
191. Perrelli G, Piolatto G. Tentative reference values for gold, silver and platinum: literature data analysis. *Sci Total Environ.* 1992 Jun 9;120(1-2):93-6.
192. Spencer WH, Garron LK, Contreras F, Hayes TL, Lai C. Endogenous and exogenous ocular and systemic silver deposition. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1980 Apr;100(Pt 1):171-8.
193. Toth V, Marschalko M, Harsing J, Karpati S. [Grayish discoloration of the face - argyria]. *Orv Hetil.* 2009 Aug 9;150(32):1503-7.

ANEXOS

Antibacterial properties of biomedical surfaces containing micrometric silver islands

This article has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text article.

2010 J. Phys.: Conf. Ser. 252 012015

(<http://iopscience.iop.org/1742-6596/252/1/012015>)

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 193.50.29.244

The article was downloaded on 09/12/2010 at 14:52

Please note that [terms and conditions apply](#).

Antibacterial properties of biomedical surfaces containing micrometric silver islands

R Pérez-Tanoira^{1,*}, C Pérez-Jorge¹, J L Endrino², E Gómez-Barrena³, D Horwat⁴, J F Pierson⁴, J Esteban¹

¹Department of Clinical Microbiology, IIS-Foundation Jiménez Díaz, Madrid, Spain

² Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, ICMM. Madrid, Spain

³ Department of Traumatology and Orthopaedic, IIS-Foundation Jiménez Díaz, Madrid, Spain

⁴ Institut Jean Lamour, Ecole des Mines de Nancy, Nancy, France

*E-mail: rptanoira@fjd.es

Abstract. A set of Cu-Mn-O and Ag-Cu-Mn-O films were sputter-deposited onto polished Ti-6Al-4V coupons and the microbiological adherence of *Staphylococcus sp.* was studied in these biomedical surfaces modified using advanced ternary and quaternary oxides that incorporated micrometric silver islands. The as-deposited ternary and quaternary compounds were amorphous. Upon air annealing the Ag-Cu-Mn-O films, silver-oxygen bonds in the compound destabilize, resulting in the segregation of metallic silver in the form of micrometric layered silver islands with high specific area dispersed at the surface of the remaining oxide. Silver is well known to have a natural biocidal character and its presence in the surface forming large micrometric escalonated islands is, in principle, predicted to enhance the antimicrobial properties of biomedical surfaces. Microbial adhesion tests were performed in triplicates using collection strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Preliminary results indicate that both strains showed decreased adherence to modified materials, *S. epidermidis* showed higher adherence these materials than *S. aureus*, however, there was no statistically significant differences between Cu-Mn-O and Ag-Cu-Mn-O containing silver islands.

1. Introduction

Prosthetic joint implants are used with increased frequency to improve our quality of life. In 2004, 265,441 total hip arthroplasties and 496,018 total knee arthroplasties were performed in U.S. alone. Of these, an estimate of 1.23% total hip arthroplasties and 1.21% total knee arthroplasties were treated for infection. About 8% of hip arthroplasties and 15% of knee arthroplasties revision surgeries were a direct result of infection [1].

The infections due to prosthetic joint implantation have severe consequences not only for patients but also for society because of long hospital stays, long and expensive treatments, and multiple surgeries with severe clinical and economic consequences [2].

Joint prosthetic infection costs about \$50,000 U.S. dollars per episode while the associated mortality rate may be as high as 2.5%. In addition, if the infection persists into the deep tissue, amputation may also be required [1].

Although they are less common than infections related to catheters, infections associated with surgical implants are generally more difficult to manage because they require a longer

Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver islands

R. Pérez-Tanoira,¹ C. Pérez-Jorge,¹ J. L. Endrino,^{2*} E. Gómez-Barrena,³ D. Horwat,⁴ J. F. Pierson,⁴ J. Esteban¹

¹Department of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, Madrid 28040, Spain

²Materials Science Institute of Madrid, ICMN, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain

³Department of Traumatology and Orthopaedics, IIS-La Paz, 28046 Madrid, Spain

⁴Institut Jean Lamour, Ecole des Mines de Nancy, Nancy-Université, UMR 7198 Nancy, France

Received 2 August 2011; revised 14 November 2011; accepted 4 January 2012

Published online 7 March 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.34090

Abstract: A set of Cu-Mn-O and Ag-Cu-Mn-O films were sputter-deposited onto polished Ti-6Al-4V coupons and the microbiological adherence of *Staphylococcus sp.* was studied in these biomedical surfaces modified by using advanced ternary and quaternary oxides, these latter incorporated micrometric silver islands. Silver is known to have a natural biocidal character and its presence in the surface of Ti-6Al-4V forming large micrometric islands. In principle, predicted to enhance the antimicrobial properties of biomedical surfaces. Microbial adhesion tests were performed using collection strains and six clinical *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. The adherence study was performed using a previously published protocol by Kinnari

et al. Collection strains and clinical strains showed decreased adherence to modified materials; however, only on the clinical strains were there statistically significant differences between Cu-Mn-O and Ag-Cu-Mn-O containing silver islands. Nanocrystalline silver dissolves and releases both Ag⁺ and Ag⁰ whereas other silver sources release only Ag⁺. We can conclude that nanocrystalline silver coating, confirmed by XRD, appears to alter the biological properties of the solution, particularly antimicrobial activity. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part A: 100A: 1521–1528, 2012.

Key Words: silver, surface treatment, nanoparticle, bacterial adhesion, biomaterials

How to cite this article: Pérez-Tanoira R, Pérez-Jorge C, Endrino JL, Gómez-Barrena E, Horwat D, Pierson JF, Esteban J. 2012. Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver islands. J Biomed Mater Res Part A 2012;100A:1521–1528.

INTRODUCTION

In the recent years, a large number of patients have improved their clinical status using orthopedic implants. However, biomaterial-related infection is an emerging problem among these patients.^{1–4} Prosthetic-joint infections have severe consequences not only for patients but also for society because of long hospital stays, long treatments, and multiple surgeries with severe clinical and economic consequences.^{5–7}

The diagnosis and treatment of prosthetic joint infections is further complicated by the development of bacterial biofilm. This structure allows bacteria to resist antimicrobial agents and immune responses.^{8–10} Patients with this type of infection require a longer period of antibiotic therapy and repeated surgical procedures.^{2,11}

Bacterial adhesion to a material surface is the first step in biofilm development. It can be described as a two-phase process including an initial, instantaneous, and reversible physical phase (phase one) and a time-dependent and irreversible molecular and cellular phase (phase two).^{12–14}

During the first phase, planktonic bacteria move onto or are moved onto a material surface because of the effects of physical forces.¹⁵ In the second phase of adhesion, molecular reactions between bacterial surface structures and substrate surfaces become predominant.^{16,17} The adherence process depends largely on the surface and near-surface atomic structure and composition of implanted biomaterials.^{18–20} Factors influencing the bacteria adherence to a biomaterial surface include chemical composition of the material, surface charge, hydrophobicity, as well as surface roughness and/or physical configuration.^{21–25}

Thus, it can be argued that the prevention of bacterial adhesion without drugs may be one of the most effective ways to reduce orthopedic implant infections.^{1,11} It would be desirable to develop biomedical coatings for implants, which are repellent to bacteria to minimize the colonization of the implant surface with circulating planktonic bacteria that can lead to biofilm development,^{7,26} especially against staphylococci, which are the leading cause of these infections.^{23,27,28}

*Present address: Abengoa Research S. L., Campus Palmas Altas, 41014 Seville, Spain.

Correspondence to: J. Esteban; e-mail: jestebanmoreno@gmail.com

Contract grant sponsor: Spanish MICINN; contract grant number: FIS2009-12964-C05-04